

Schlussbericht

Forschungsvorhaben zur Bereitstellung wissenschaftlicher Entscheidungshilfe für das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz (BMELV)

Teilprojekt

Erarbeitung von Erkenntnissen zur Biologie des Westlichen Maiswurzelbohrers
Förderkennzeichen: 2809HS002

Laufzeit: 01.05.2009–30.04.2012, verlängert bis 18.09.2012

Berichtszeitraum: 01.05.2009–18.09.2012

Name und Anschrift der ausführenden Stelle

BTL Bio-Test Labor GmbH Sagerheide

Forschungsgruppe Phyto-Entomologie

Birkenallee 19

D-18184 Thulendorf/Sagerheide

E-Mail: tt@biotestlab.de

Tel.: 038204 12981

Fax: 038204 12980

Name des Projektleiters

Dr. T. Thieme

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Inhaltsverzeichnis.....	2
I. Kurzdarstellungen.....	3
1. Aufgabenstellung.....	3
2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde.....	3
3. Planung und Ablauf des Projektes.....	3
4. Wissenschaftlich-technischer Stand, an den angeknüpft wurde.....	3
5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen.....	5
6. Erzielte Ergebnisse.....	5
7. Voraussichtlicher Nutzen.....	6
8. Bekannt gewordene Fortschritte.....	6
II. Eingehende Darstellung.....	7
1. Einleitung.....	7
2. Material und Methoden.....	8
3. Ergebnisse.....	17
4. Schlussfolgerungen.....	41
5. Literatur.....	42
III. Erfolgskontrollbericht.....	44
1. Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen.....	44
2. Wissenschaftlich-technisches Ergebnis des Vorhabens, Nebenergebnisse und gesammelte wesentliche Erfahrungen.....	44
3. Fortschreibung Verwertungsplan.....	45
4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben.....	45
5. Präsentationsmöglichkeiten.....	45
6. Einhaltung Ausgaben-und Zeitplanung.....	46
IV. Kurzfassung.....	47
IV. Abstract.....	48

I. Kurzdarstellungen

1. Aufgabenstellung

Ziel des Projektes war es, Daten als Grundlage für die Modellierung und Erstellung von Prognosen zum Auftreten und zur optimalen Bekämpfung von *Diabrotica v. virgifera* zu erarbeiten. Verfügbare Vorhersagemodelle für *Diabrotica* beruhen insbesondere auf Ergebnissen aus den USA. Zwischen amerikanischen nicht-diapausierenden Tieren und den in Europa auftretenden Populationen bestehen jedoch z. T. erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Fitness und Mobilität, die für die Treffsicherheit von Prognosen von erheblicher Bedeutung sind und für die Berechnung von Temperatursummen für Prognosezwecke genutzt werden können. Für eine derartige Prognose in Deutschland werden biologische Daten von in Europa auftretenden *Diabrotica v. virgifera* benötigt.

2. Voraussetzungen, unter denen das Vorhaben durchgeführt wurde

In der Forschungsgruppe Phyto-Entomologie des BTL liegen langjährige Erfahrungen in der Bearbeitung von Wechselbeziehungen zwischen Wirtspflanzen, ihren Parasiten und deren Gegenspieler vor. Seit mehreren Jahren arbeitet BTL in gemeinsamen Projekten mit dem Julius-Kühn-Institut (JKI) an der Nutzung biotechnologischer Methoden zur Identifizierung und Überführung von Resistenzmechanismen aus Wildarten des Genus *Solanum* in die Kulturkartoffel. Schwerpunkte sind dabei Resistenzen von Wirtspflanzen gegen tierische Schaderreger.

3. Planung und Ablauf des Projektes

Das Projekt gliederte sich grob in die Etappen:

- Anzucht von Futterpflanzen für die Zuchten von *D. v. virgifera* und für Versuchsdurchführungen
- Untersuchung der Embryonalentwicklung der Eier
- Untersuchung der post-diapausalen Entwicklung der Eier
- Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Temperaturen und Individuendichten auf die Entwicklung der Larven
- Untersuchung der Wirtsfindung/Orientierung der Larven im Boden
- Analyse der Hungerfähigkeit von Larven

4. Wissenschaftlich-technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Der Westlichen Maiswurzelbohrer (*Diabrotica v. virgifera*) ist in den USA einer der wichtigsten Maisschädlinge und verursacht dort jährlich ca. 1 Mrd. USD an Schäden und Aufwendungen für die Bekämpfung. Seit seiner Einschleppung in Europa breitet sich dieser Käfer zunehmend aus und hat 2007 Deutschland (Bayern und Baden-Württemberg) erreicht. *Diabrotica* ist der Schaderreger, gegen den sich weltweit die meisten Insektizidanwendungen richten. Hinweise auf das Auftreten von insektizidresistenten *Diabrotica* führten in den USA zur intensiven Suche nach *Diabrotica*-Resistenz im Mais (MOELLENBECK et al. 1997) und letztlich zur Schaffung von *B.t.*-Mais. Durch den Anbau von *B.t.*-Mais besteht jedoch die Gefahr, dass es zu einer Resistenzentwicklung der Maiswurzelbohrer gegenüber dem *B.t.*-Toxin kommt. Eine umfassende Analyse der verschiedenen Toxine erfordert Versuche mit künstlichen Diäten (PLEAU et al. 2002). Die meisten Diäten wurden für Schmetterlinge entwickelt (SINGH & MOORE 1985) nur wenige für Käfer (AVILA et al. 2000, ROSE & MCCABE 1973, TRAN & MARRONE 1988). Die für verschiedene Arten der Gattung *Diabrotica* entwickelten Diäten, besitzen nach PLEAU et al. (2002) nur geringe Eignung für *D. virgifera*. Die von diesen Autoren vorgestellte Diät wurde aber lediglich für das 1. Larvenstadium einer nicht-diapausierenden Linie von *D. virgifera* optimiert. Zwischen der Biologie und Schadwirkung nicht-diapausierender und diapausierender Tiere gibt es aber deutliche Unterschiede (BRANSON et al. 1981). Eine einfache Diät für die Haltung der Larven von diapausierenden *D. v. virgifera* stellten KHOSBAYER et al. (2002) vor. Ihre Methode ist aber lediglich geeignet eine Dauerzucht zu erhalten und bewirkt große Variabilität in der Eiablage. Eine optimale Diät für europäische Herkünfte der Zielart ist somit derzeit nicht verfügbar.

Bei der Entwicklung einer Methode zur Prüfung der Sensitivität von *Diabrotica* ist zu berücksichtigen, dass die subterranean lebenden Larven andere Ansprüche an das Futter und den Lebensraum stellen als die Adulten. Neben der Futterqualität wird die Leistung der Larven auch durch biotische und/oder abiotische Faktoren im Boden beeinflusst (ELLIOTT et al. 1989, TITARENKO & CHRISPEELS 2000). Porengröße und Vernetzung der Poren des Substrates sind für die Bewegung der Larven und letztlich für das Erreichen der Nahrungsressource wesentlich (GUSTIN & SCHUMACHER 1989). Schadwirkung und Mortalität sollen nach ELLIOTT et al. (1989) von der Besiedlungsdichte der Larven abhängig sein. FISHER et al. (1986) wiesen nach, dass die Eiablage der Weibchen und die Schadwirkung der Larven durch die Qualität des Futters der Adulten beeinflusst wird.

Untersuchungen des Verhaltens der Larven im Boden/Substrat sind erforderlich, um Einflüsse der über Wurzeln in die direkte Umgebung in den Boden abgegebenen Substanzen auf *D. v. virgifera* zu analysieren. Unterschiede zwischen den Nahrungsaufnahmeorten der Larven an einer transgenen Pflanze (MON863) und ihrer isogenen Linie beobachteten CLARK et al. (2002) an Maiskeimlingen. Ihre Versuchstiere gehören aber zu einer nicht-diapausierenden Linie und sind nicht mit den europäischen Herkünften vergleichbar. Die für die Wirtsfindung/Orientierung der Larven vermuteten Mechanismen werden in der Literatur kontrovers diskutiert. Für mehrere Autoren besteht Konsens darüber, dass die Larven sich im Boden an einem CO₂-Gradienten orientieren. Es blieb in ihren Versuchen aber unberücksichtigt, dass (1) auch die Nicht-Wirtspflanzen CO₂ emittieren (und damit eine Reizquelle für die Larven darstellen) und (2) im Boden auch ein horizontaler CO₂-Gradient (mit zunehmender Konzentration in Richtung Bodenoberfläche) besteht. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die Wirtsfindung der Larven im Boden und somit die Vermeidung von Hungerphasen, zumindest nicht nur durch Orientierung an CO₂-Quellen erfolgt (JOHNSON & GREGORY, 2006).

Zitierte Literatur:

- AVILA CJ, TABAI ACP & PARRA JRP (2000): Rearing techniques of *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) on natural and artificial diets. *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil* **29** (2).
- BRANSON TF, SUTTER GR & FISHER JR (1981): Non-diapause eggs of western corn rootworms in artificial field infestations. *Environmental Entomology* **10** (1).
- CLARK PL, FOSTER JE & VAUGHN TT (2002): *Diabrotica virgifera virgifera* larval feeding behaviour on transgenic and isoline maize plants. http://esa.confex.com/esa/2002/techprogram/paper_5421.htm.
- ELLIOTT NC, SUTTER GR, BRANSON TF & FISHER JR (1989): Effect of population density of immatures on survival and development of the western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Entomological Science* **24** (2).
- FISHER JR, JACKSON JJ, SUTTER GR & BRANSON TF, (1986): Influence of adult diet on damage to corn by larvae of the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology* **79** (1).
- FISHER JR, BRANSON TF & SUTTER GR (1984): Use of common squash cultivars, *Cucurbita* spp., for mass collection of corn rootworm beetles, *Diabrotica* spp. (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* **57** (3).
- GUSS PL, BRANSON TF & KRYSAN JL (1976): Adaptation of a dry diet for adults of the western corn rootworm. *Journal of Economic Entomology* **69** (4).
- GUSTIN RD & SCHUMACHER TE (1989): Relationship of some soil pore parameters to movement of first-instar western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental Entomology* **18** (3).
- JOHNSON SN & GREGORY PJ (2006): Chemically-mediated host-plant location and selection by root-feeding insects. *Physiological Entomology* **31**, 1–13.
- KHOSBAYER B, KOMAROMI J & KISS J (2002): Egg production of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) in laboratory rearing. *Novenyvedelem* **38** (10).
- MOELLENBECK DJ, BERGVINSON DJ, BARRY BD & DARRAH LL (1997): Advances in rating and phytochemical screening for corn rootworm resistance. Insect resistant maize: recent advances and utilization. Proceedings of an International Symposium held at the International Maize and Wheat Improvement Center, 27 November-3 December 1994.

- PLEAU MJ, HUESING JE, HEAD GP & FEIR DJ (2002): Development of an artificial diet for the western corn rootworm. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **105** (1).
- ROSE RI & MCCABE JM (1973): Laboratory rearing techniques for the southern corn rootworm. *Journal of Economic Entomology* **66** (2).
- SINGH P & MOORE RF (Eds.) (1977): *Artificial Diets for Insects, Mites, and Spiders*. Vols. I and II, Elsevier, New York.
- TITARENKO E & CHRISPEELS MJ (2000): cDNA cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the alpha -amylases of the Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30** (10).
- TRAN MT & MARRONE PG (1988): Bacteria isolated from Southern corn rootworms, *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: Chrysomelidae), reared on artificial diet and corn. *Environmental Entomology* **17** (5).

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Alle Untersuchungen wurden fortlaufend mit den das Projekt koordinierenden Kollegen des JKI Braunschweig (Institut für Pflanzenschutz in Ackerbau und Grünland) abgestimmt. Zwischenergebnisse wurden diskutiert und notwendige Änderungen in der Versuchsplanung besprochen. Ein reger Gedankenaustausch über den Westlichen Maiswurzelbohrer wurde auch mit Herrn Dr. P. Baufeld (JKI, Institut für nationale und internationale Angelegenheiten der Pflanzengesundheit) und Herrn Dr. M. Zellner (Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft) durchgeführt. Prof. P. Leinweber (STZ Soil Biotechnology) verfügt über langjährige Erfahrungen auf dem Gebiet der Bodenkunde, die vorhandenen Geräte und etablierten Methoden gestatten auf qualitativ höchstem Niveau eine schnelle Bearbeitung der den Versuchsböden entnommenen Proben. Das STZ wurde gewählt, da es zur Einhaltung der Quarantänebestimmungen erforderlich ist, die Analysen von einem ortsansässigen Labor durchführen zu lassen. Darüber hinaus erfolgte eine sehr enge und gute Kooperation mit den österreichischen Kollegen (AG GRABENWEGER, AGES Wien).

6. Erzielte Ergebnisse

Es wurde analysiert, ob zwischen den verschiedenen Herkünften Unterschiede in der Embryonalentwicklung bestehen. Hierfür wurden die Anteile schlupfbereiter Eier ohne Diapause bestimmt. In den *Diabrotica*-Stämmen der Käfer aus Ungarn bzw. Italien konnte kein Nachweis für eine Entwicklung ohne Diapause erbracht werden. Ohne Kühlagerung (=Diapause) erfolgte kein Schlupf. Der in den USA selektierte nicht-diapausierende Stamm ist auf einen Zufallsfund zurückzuführen.

Es wurde untersucht, wie der Zeitverlauf der post-diapausalen Entwicklung der Eier erfolgt. Hierfür wurde ermittelt, dass der Schlupf im ungarischen und italienischen Stamm nach 66 Tagen begann, 50% der Eier schlüpft im ungarischen Stamm nach 90 Tagen und im italienischen nach mehr als 133 Tagen. Das Ende des Schlupfes konnte nicht erfasst werden, da die Versuche wegen der stark zunehmenden Verpilzung der Eier nach 140 Tagen abgebrochen werden mussten.

In Laborversuchen wurde die imaginale Entwicklung des Schaderregers untersucht. Hierfür wurden zur Bestimmung biometrischer Daten einzelne Larvenstadien in unterschiedlichen Larvendichten verschiedenen Temperaturen ausgesetzt. Vergleiche der eigenen Werte mit den publizierten Werten zeigten, dass die morphometrischen Daten der Larven des italienischen Stamms denen des nicht-diapausierenden Stamms entsprechen. Die Larven dieser Stämme sind deutlich größer als die ungarischen Tiere. Die Trockengewichte der Larven nehmen mit zunehmender Temperatur zu. Das 2. Larvenstadium des nicht-diapausierenden Stamms erreicht bei 15°C (20°C) 75,3% (83,2%) des Trockengewichts von 25°C. Die Variation der Larvendichten induzierte unterschiedlich ausgeprägte Konkurrenzsituationen und lässt daraus resultierend unterschiedliche Nahrungsversorgung erwarten, wodurch Tiere unterschiedlicher Größe produziert werden könnten. Die Erhöhung der Besiedlungsdichte induziert jedoch keinen Effekt auf die morphometrischen Daten (z.B. Kopfkapselbreite) der Larven des nicht-diapausierenden Stamms. Im Gegensatz dazu sind die Kopfkapselbreiten des 1. und 2.

Larvenstadiums des ungarischen Stamms bei höherer Besiedlungsdichte kleiner. Zwischen dem Gewicht der Larven und der adulten Käfer ließen sich direkte Zusammenhänge nachweisen. Da sich im nicht-diapausierenden Stamm die größeren Larven entwickelten, bildeten diese dann die größeren adulten Käfer, die auch eine höhere Fruchtbarkeit besaßen.

Die Wirtsfindung bzw. Orientierung der Larven im Boden konnte in Laborversuchen in Nicht-Wahl- und in Wahl-Situationen analysiert werden. Es wurde deutlich, dass die Versuchsdauer durch Nutzung des 1. Larvenstadiums reduziert werden kann. Die Resultate der Versuche zeigen, dass auch Pflanzen die nicht zum Wirtsspektrum gehören eine anlockende Wirkung auf die Larven haben. Für die Untersuchung der Orientierung der Larven im Boden waren chemische Analysen erforderlich, die als Dienstleistung durch das STZ Soil Biotechnology erbracht wurden. Die vom STZ gewonnenen Ergebnisse der bodenkundlichen Analysen lassen die Bedeutung der Dihydroxystearinsäure für die Orientierung der *Diabrotica*-Larven vermuten. Dabei ist zu berücksichtigen, dass von den Pflanzen produzierte/freigesetzte Inhaltsstoffe sehr wohl unterschiedliche Funktionen für die verschiedenen Herbivoren haben können.

Für die Modellierung der Populationsdynamik von *D. v. virgifera* ist die Fähigkeit der Larven, Futtermangel zu überstehen, eine wichtige Größe. Deshalb wurden Laborversuche durchgeführt, in denen die Larven nach Bestimmung ihres Ausgangsgewichts unterschiedlichen Hungerperioden ausgesetzt und danach die Anzahl der Überlebenden und deren biologische Leistung (Gewicht) bestimmt wurden. Die Überlebensrate des ersten Larvenstadiums von *Diabrotica* des nicht-diapausierenden Labor-Stamms nimmt mit zunehmender Hungerperiode und anschließender Fütterung für 2 Tage zu. Eine Überlebensrate von 0,02 (=50% Mortalität) ist nach einer Hungerperiode von 1,816 Tagen erreicht.

7. Voraussichtlicher Nutzen

Die durchgeführten Untersuchungen demonstrieren, dass die in den USA gewonnenen Daten aus Versuchen mit nicht-diapausierenden Laborstämmen des Quarantäneschaderregers *Diabrotica v. virgifera* nur bedingt auf die Situation in Europa übertragbar sind. Die Untersuchungen über die Entwicklung der Eier, Larven und Imaginalstadien liefern Daten über die Biologie, die für die Modellierung der Populationsdynamik des Schaderregers genutzt werden sollen. Sie erlauben die gezielte Bewertung des Schadpotentials von *Diabrotica v. virgifera* und können Grundlage für die verbesserte Regulierung/Bekämpfung des Schaderregers bilden.

Die methodischen Grundlagen der Untersuchungen bilden die Voraussetzung für mögliche weiterführenden Förderanträge.

8. Bekannt gewordene Fortschritte

Der Projektnehmer nutzte regelmäßig Literaturdatenbanken (Web of Knowledge, Zoological Record, Scopus etc.), um aktuelle Publikationen zu prüfen und in eine vorhandene Literaturdatenbank einzupflegen. Im Berichtszeitraum wurden nach Wissen des Projektnehmers keine Ergebnisse publiziert, die für die Durchführung des Projekts relevant sind.

Bei dem Treffen der Internationalen Arbeitsgruppe für *Ostrinia* und andere Maisschädlinge (IWGO, IOBC/WPRS, 24.-26.10.2011) präsentierten Kollegen der Georg August-Universität Göttingen (A. Wilstermann, S. Vidal) Ergebnisse eines Projekts, in dem u. A. die Effekte variierender Tag-Nacht Temperaturen auf den Schlupf und die Entwicklung von *Diabrotica*-Larven untersucht wurden. Bei gleichen Temperatursummen, sollen wechselnde Temperaturen einen früheren Schlupf und eine schnellere Entwicklung der Larven als ein konstantes Temperaturregime verursacht haben.

II. Eingehende Darstellung

1. Einleitung

Der westliche Maiswurzelbohrer, *Diabrotica v. virgifera* LÉCONTE 1868, ist einer der bedeutendsten Schaderreger im intensiven Maisanbau. Er wurde aus Nord-Amerika per Flugzeug mehrfach nach Europa verschleppt und breitet sich hier seit Anfang der 1990-er Jahre stetig aus. Es etablierten sich ökonomisch relevante Vorkommen im Südosten Europas (z.B. Balkan-Staaten, N-Italien, Rumänien und Ungarn) und auch in den südlichen und östlichen Landesteilen von Österreich, Polen, der Schweiz, Slowakei und Tschechien treten die Käfer auf. Trotz der bestehenden Einstufung als Quarantäneorganismus und aufwändigen Ausrottungs- und Eingrenzungsmaßnahmen, kam und kommt es jährlich zu Neufunden in bislang unbesiedelten Gebieten (z. B. Griechenland, Frankreich, Niederlande) und zu einer Ausweitung befallener Flächen. In Deutschland wurde der Käfer erstmals 2007 nachgewiesen und breitet sich seit dem auch hier weiter aus.

Als wichtigste Bekämpfungsoptionen gegen den westlichen Maiswurzelbohrer (WMB) werden gegenwärtig gesehen: 1. eine wechselnde Fruchtfolge, die voraussetzt, dass die im späten Frühjahr schlüpfenden Larven sich nicht an anderen Kulturen als Mais entwickeln können. Dadurch werden der Generationszyklus wirksam unterbrochen und die Schaderregerdichten unter der ökonomischen Schadschwelle gehalten. 2. chemische Bodeninsektizide (Saatgutbeizen und Granulate), die je nach Befallsstärke, Bodentyp und Witterungsverlauf die Wurzeln der Pflanzen vor dem Fraß der Larven schützen können, und 3. die Reduktion adulter Käfer mit Spritzapplikationen von Insektiziden. Da die erwachsenen Käfer in der Regel nur geringe Schäden verursachen (z. B. unregelmäßige Befruchtung des Kolbens durch Befressen der Seide, Blattschabefraß) wird mit dieser Maßnahme primär die Eiablage verhindert/reduziert und dadurch eine Reduktion des Populationswachstums erreicht. Biologische (z.B. entomopathogene Nematoden) oder gentechnische Bekämpfungsoptionen (Bt-Mais) stehen derzeit in Europa nicht zu Verfügung.

Erfahrungen aus den USA zeigen, dass alle großflächig und vor allem einseitig genutzten Bekämpfungsoptionen durch die enorme ökologische Plastizität des WMB ihre Wirksamkeit verlieren können. Beispielsweise sind Resistenzen gegen chemische Insektizide verschiedener Wirkstoffklassen, sowohl bei Larven, als auch adulten Käfern, bekannt. Selbst die wechselnde Fruchtfolge wurde durch eine Veränderung des Eiablageverhaltens in Teilen des amerikanischen ‚Corn-Belt‘ (Illinois und Indiana) unwirksam. Darüber hinaus ist die Nutzung chemischer Insektizide aufgrund von Nebenwirkung auf sogenannte Nichtzielorganismen mit ökologischen Bedenken verbunden. Insbesondere die Verwendung von Bodeninsektiziden wird kritisch hinterfragt, nachdem im Frühjahr 2008 im Süden Deutschlands massive Bienenschäden auftraten. Bodeninsektizide werden auch deshalb kritisch betrachtet, da sie zwar in der Lage sind, die Pflanzen und den Ertrag zu schützen, aber in nur geringem Maße das Populationswachstum des WMB reduzieren.

Es besteht daher Einigkeit darin, dass keine der zur Verfügung stehenden Bekämpfungsoptionen die alleinige Lösung des Maiswurzelbohrer-Problems sein kann. Vielmehr sind alle denkbaren Möglichkeiten zu prüfen und in einem integrierten Ansatz zu nutzen. Dabei sind Brücken zu schlagen, zwischen möglichst nachhaltig wirksamen Maßnahmen, die sowohl den ökonomischen Belangen der Landwirte Rechnung tragen, als auch ökologische Bedenken ausreichend berücksichtigen.

Daraus ergeben sich folgende Teilaufgaben (TA) die zu bearbeiten waren:

- TA 1 Vorbereitung der Versuche und Abstimmung mit dem JKI.
- TA 2 Anzucht von Futterpflanzen im Gewächshaus für die Zuchten der verschiedenen Herkünfte von *Diabrotica v. virgifera* und für Versuchsdurchführungen.
- TA 3 Laborversuche zur Untersuchung der Embryonalentwicklung der Eier.
- TA 4 Laborversuche zur Untersuchung der post-diapausalen Entwicklung der Eier.

- TA 5 Laborversuche zur Untersuchung der Entwicklung der Larven (Einfluss unterschiedlicher Temperaturen und Individuendichten auf die biologische Leistung).
- TA 6 Laborversuche zur Untersuchung des Einflusses von Bodenfeuchte und –körnung auf die Wirtsfindung/Orientierung der Larven im Boden.
- TA 7 Laborversuche über die Hungerfähigkeit der unterschiedlichen Larvenstadien.
- TA 8 Erstellung eines Zwischenberichtes bzw. des Abschlussberichtes, Vorbereitung von Publikationen.

Zur Entscheidungsfindung über Fortsetzung, Modifikation oder Abbruch der Versuche wurden folgende Meilensteine geplant:

- M1 06/2009 Ergänzung der vorhandenen Zuchten (Tiere aus Ungarn und den USA, nicht-diapausierender Stamm) mit einer Herkunft aus Italien abgeschlossen
- M2 05/2010 Versuche zur Entscheidung über Berücksichtigung weiterer europäischer Herkünfte des *Diabrotica v. virgifera* abgeschlossen
- M3 06/2010 Errichtung einer weiteren Zucht mit Tieren aus Österreich abgeschlossen
- M4 10/2010 Versuche zur Entscheidung über Berücksichtigung chemischer Analysen zur Orientierung der Larven von *Diabrotica v. virgifera* im Boden abgeschlossen

2. Material und Methoden

TA 1 – Die thematische und organisatorische Abstimmung mit Kollegen des BLE und JKI wurde seit Projektbeginn kontinuierlich durchgeführt. Bei einem ersten lokalen Projekttreffen (BTL Sagerheide, 09.-10.11.2009) wurden Vertretern beider Institutionen laufende Tests und der Stand geplanter Versuche demonstriert. Parallel erfolgte die Diskussion fachlicher Fragestellungen.

Auf dem ersten projektübergreifenden Verbundtreffen (LfL Freising, 01.-02.12.2009) wurde in zwei Vorträgen ein Überblick über die geplanten Versuche des Projektnehmers gegeben und erste Ergebnisse vorgestellt.

TA 2 – Die Anzucht von Futterpflanzen für die Zuchten und Versuche erfolgte nach Bedarf im klimatisierten Gewächshaus bei 20 °C, 65 ± 10 % RF und Langtagbedingungen (16:8 h Tag:Nacht). Bei Unterschreiten des natürlichen Umgebungslichts unter 10.000 lux erfolgte eine zusätzliche Beleuchtung mit 400 W Philips Son-T Agro Natriumdampflampen. Die Regelung aller Kabinen-Parameter (Temperatur, Luftfeuchte, Beleuchtung etc.) erfolgt mittels eines ‚Klimarechners‘ und wird kontinuierlich protokolliert. Die Zucht der *Diabrotica*-Herkünfte erfolgte in Quarantäneräumen. Für die Larven wurden Maiskeimlingen der Sorte Tassilo genutzt. Die Versorgung der adulten Käfer erfolgte mit frischen Blättern junger Maispflanzen, Maispollen, Maiskolben, Zucchini, Apfelstücken, Salat und Wasser.

TA 3 – Für die Bestimmung der prä-diapausalen Schlupfrate wurden Eier der ungarischen (HU) und der italienischen (IT) Population verwendet. Die Eier wurden ab 11.09.09 in Ungarn (HU) und im Labor von BTL (IT) produziert. Die Dauer der Eiablage unterschied sich: IT=21 d; HU=9 d. Bis zum Versuchsbeginn wurden die Eier ohne Kühlung in feuchtem, mit 200 µm Maschenweite gesiebten Sand gelagert (HU: 16 °C, IT: 25°C). 52 Tage nach Beginn der Eiablagen wurden die Eier ausgewaschen (250 µm Maschenweite), aufgeschwemmt (1,25 M MgSO₄) und oberflächlich sterilisiert (5' 0,05 % NaOCl + 2' 0,25 % Peressigsäure). Anschließend wurden die Eier in eine 0,15 %-ige Agarlösung überführt und auf 30 mm Filterpapierscheiben pipettiert. Als Versuchsgefäße wurden 30 mm Petrischalen mit belüftetem Deckel (10 mm Bohrung mit 100 µm Metallgaze) genutzt. Von der italienischen Population standen weniger Eier zur Verfügung als von der ungarischen (s. Tab. 1).

Tab. 1 – Daten zur Produktion der Eier

Population	Ungarn (Kardoskut)	Italien (Brescia)
Beginn Eiablage	11.09.09	11.09.09
Ende Eiablage	20.09.09	02.10.09
Lager-Temperatur (°C)	16	25
Ei-Alter (max) zu Versuchsbeginn (d)	52	52
Eier gesamt (Eiagar)	≈ 2000	≈ 400
Eier/Petrischale	64,2	31,6
Petrischalen	30	10

Zur Erfassung der Anzahl geschlüpfter Larven wurden die Petrischalen beider Herkünfte in regelmäßigen Abständen bonitiert. Um die Verpilzung ungeschlüpfter Eier zu vermeiden, wurden Larven und leere Ei-Hüllen entfernt. Die Bonituren der Petrischalen wurden 80 Tage nach Versuchsbeginn beendet.

TA 4 – Die Bearbeitung dieser TA erfolgt nach Beendigung der Diapause ab Februar 2010. Die Entwicklung post-diapausaler Eier beginnt ab Temperaturen > 11°C. Für deren Erfassung wurden für die verschiedenen *Diabrotica*-Herkünfte der Beginn des Larven-Schlupfes nach der winterlichen Ruhephase und der Zeitpunkt bis zu dem 50 % der Larven schlüpften ermittelt. Dazu wurden im Frühjahr 2010 Eier aus Ungarn und Italien ausgewaschen, durch Aufschwämmtechniken mit 1,25 M MgSO₄ von Bodenpartikeln gleicher und kleinerer Größe getrennt und oberflächlich mit Peressigsäure und Natriumhypochlorid desinfiziert. Trotz dieser Maßnahmen war ein Großteil der Eier stark durch Pilze und Bakterien befallen. Diese mikrobielle Infektion führte zum Absterben der Eier und einer verringerten Schlupfrate. Da aus früheren Versuchen bekannt ist, dass die Dauer der Ei-Lagerung bei < 9 °C einen Einfluss auf die Schlupfgeschwindigkeit und -rate besitzt, wurden die Versuche nicht zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt, sondern im Frühjahr 2011 durchgeführt. Um bei der Wiederholung der Untersuchungen eine ähnlich starke mikrobielle Kontamination auszuschließen, wurden in zusätzlichen Versuchen weitere Desinfektionsmöglichkeiten (insbesondere Fungizide) eingesetzt.

TA 5 – Die Versuche zum Einfluss der Temperatur auf die Entwicklung der Larven wurden nach Auswertung der Bodentemperaturen (5 und 10 cm Tiefe) von zwölf Stationen des Deutschen Wetterdienstes (DWD) bei 15, 20 und 25 °C durchgeführt (Abb.1).

Die Entwicklungsgeschwindigkeit wurde zunächst für Larven des nicht diapausierenden Laborstamms bei 20±1°C erfasst. Dazu wurden je 50 frisch geschlüpfte Larven in 1 l Plastiktöpfe überführt, in denen zuvor 15–20 Maiskeimlinge wuchsen. Um die Tiere zu extrahieren, wurden Erde und Maispflanzen von je vier Töpfen in regelmäßigen Abständen vorsichtig per Hand durchsucht und danach für bis zu drei Tagen eine Wärmeextraktion (MacFayden-Apparatur) durchgeführt. Anschließend wurden mit einer Kombination aus Auflichtmikroskop (Olympus SZX 12), einer CCD-Kamera (ColorView III, Olympus) und des Softwarepakets cell^D (Olympus) die Kopfkapselbreiten (KKB) der Larven vermessen und nach Trocknung der Tiere (mindestens 48 h bei 40°C) deren Gewicht erfasst (Mikrowaage XP 26, d=1 µg; Mettler-Toledo).

Da die Ergebnisse dieser Versuche die experimentelle Grundlage für das zu erstellende Modell der Populationsdynamik darstellen, wurde das experimentelle Design intensiv mit Herrn Ballschmitter (JKI Kleinmachnow) diskutiert und abgestimmt. Die Untersuchung des Einflusses verschiedener Larvendichten (innerartliche Konkurrenz, Nahrungsknappheit) erfolgte mit zwei Dichten (40 vs. 80 Tiere) bei 20 °C. Details über das Versuchsdesign sind in Tab. 2 und Abb. 2 dargestellt.

Weil die Entwicklung der Larven bei geringerer Temperatur langsamer erfolgt, wurden für die Variante 15°C mehr Auflösungen (bis zu 14, =79 Tage nach Überführung der Larven in die

Plastiktöpfe) durchgeführt als in den Varianten 20°C (8 Auflösungen) und 25°C (6 Auflösungen). Wie unter TA 4 beschrieben, erfolgt die Erfassung der Larven-Fitness durch die Messung von KKB und Trockengewicht.

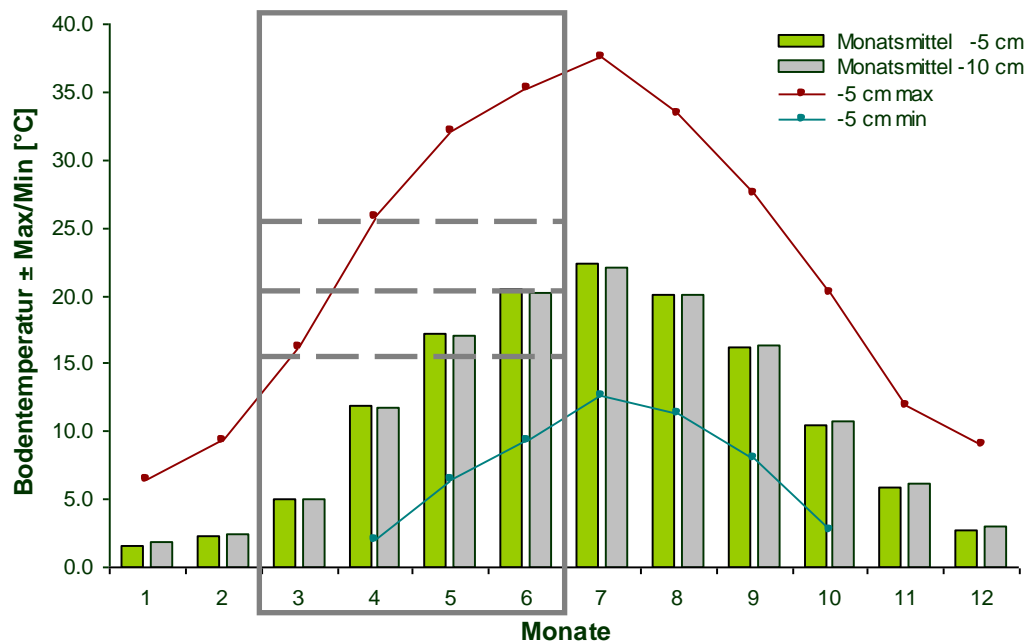


Abb. 1: Mittlere Bodentemperaturen von 12 Stationen des DWD (Zeitraum 2006–2009); grauer Rahmen: zu erwartendes Auftreten von Larven, grau-gestrichelte Linien: Versuchstemperaturen.

Tab. 2: Übersicht der Versuchsvarianten und Auflösungsabstände zur Untersuchung des Einflusses von Temperatur (°C) und Populationsdichte des ersten Larvenstadiums (L1) auf die Fitness von *D. v. virgifera*.

Stamm	Nicht-diapausierender Laborstamm				Ungarischer Feldstamm			
	15	20	20	25	15	20	20	25
Temperatur	15	20	20	25	15	20	20	25
L1 je Becher	40	40	80	40	30	30	80	30
Auflösung nach Tagen	2	2	2	2	3	3	3	3
	5	4	4	4	5	5	5	5
	8	7	7	7	8	8	8	8
	12	10	10	10	11	11	10	11
	17	14	14	14	15	15	14	15
	22	18	17		22	19	18	19
	30	22	21		29	23	22	
	37				36	27	26	
44				42				
51				49				
58				56				
65				63				

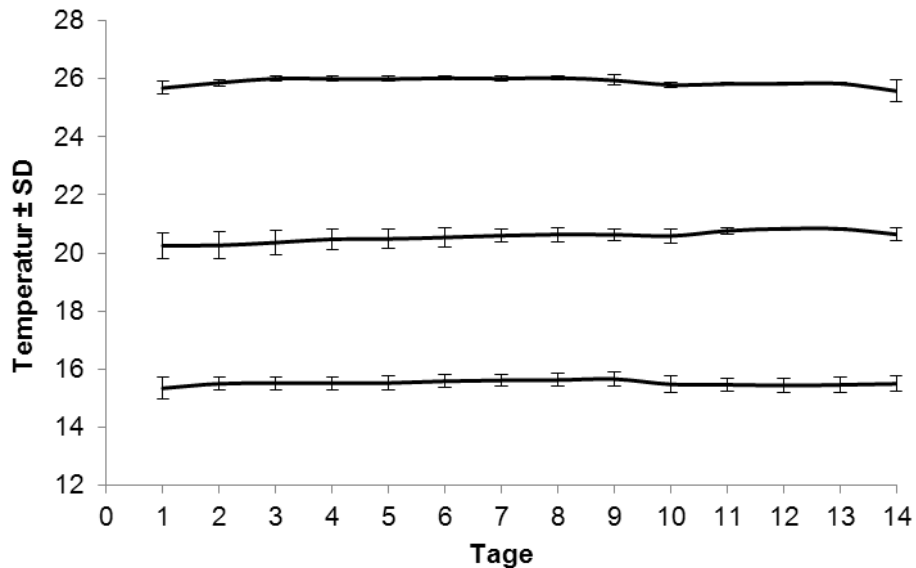


Abb. 2: Tagesmittelwerte \pm SD ($^{\circ}$ C) der in den Versuchskabinen gemessenen Temperaturen (Messintervall = 5 Minuten).

In den Versuchen zur Entwicklung der Larven kam es durch Infektionen der Zuchten mit Trauermücken (Diptera: Sciaridae) und Milben (Acari) zu zeitlichen Verzögerungen (Abb. 3 A, B). Sowohl die Trauermückenlarven, als auch die Milben entwickelten sich in den Eiablageschalen offensichtlich an *Diabrotica*-Eiern. In einigen Schalen waren nahezu alle Eier durch Sciariden-Larven konsumiert, so dass sich die Zahl der für die Versuche zu Verfügung stehenden Eier stark reduzierte. Durch die Infektion mit Trauermücken und Milben wurde zusätzlich die Qualität der verbleibenden Eier stark reduziert. Trotz der angewandten Oberflächendesinfektion kam es bei der Anzucht der Larven für die Versuche zu einer starken Verpilzung sich entwickelnder Eier. Die Schlupfrate der Eier war deshalb ungewohnt gering und asynchron.

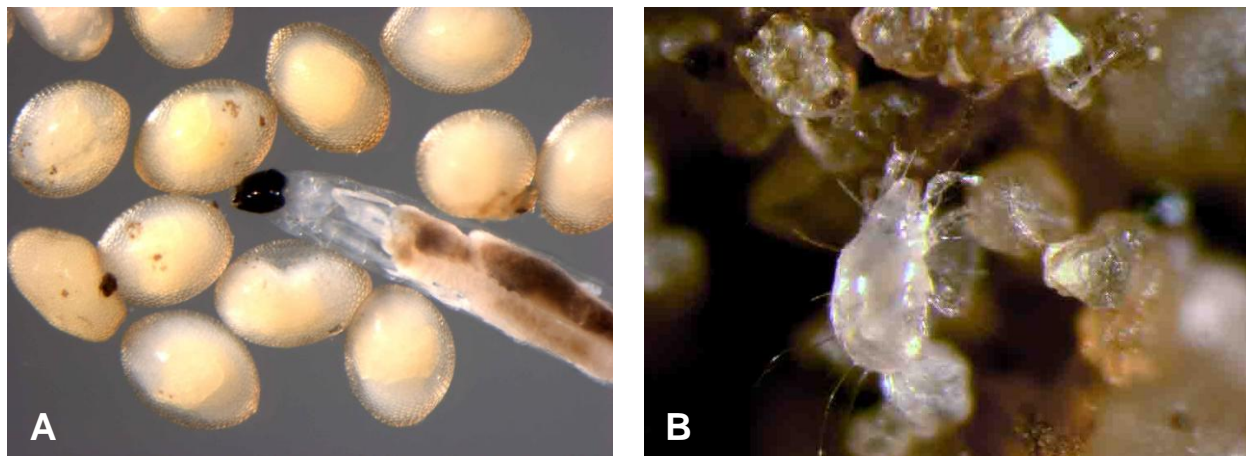


Abb. 3: Infektion gelagerter Eier mit A – Trauermücken (Sciaridae) und B – Milben (Acari).

Mit Siebungen, Aufschwemmungen und der Dampfsterilisation des Eiablagesubstrats wurde versucht die Infektionen in aktuellen Zuchten und den Eilagerschalen zu reduzieren. Insbesondere die Milben-Infektion konnte jedoch nur bedingt eingegrenzt werden und es kam trotz umfangreicher Maßnahmen mehrfach zu Verschleppungen in Folgegenerationen. Eine weitere Schwierigkeit, die die Durchführung der Versuche behinderte, war mit *Fusarium* belastetes Saatgut. Da negative Auswirkungen sonst üblicher Fungizidbeizen nicht ausgeschlossen werden können, wurde unbehandeltes Saatgut bezogen. Die standardisierte Desinfektion mit Natriumhypochlorid-Lösung (NaOCl) war nicht ausreichend und auch andere

nachfolgend getestete Desinfektionsmethoden konnten den *Fusarium*-Befall nicht ausreichend reduzieren. Diese Problematik konnte durch Verwendung einer anderen Saatgut-Charge gelöst werden.

Für die Bestimmung des Fettgehalts als Fitnessmerkmal der Tiere wurden zwei Methoden etabliert. Bei der einfacheren gravimetrischen Fettbestimmung, werden die Larven bei 40 °C für mindestens 48 h getrocknet, das Trockengewicht bestimmt und anschließend mehrfach mit Petroläther „entfettet“. Nach einer erneuten Trocknung erfolgt die Referenzwägung des fettfreien Trockengewichts. Durch Subtraktion der Trockengewichte kann dann der Fettgehalt bestimmt werden (MILLS, 1981). Da aufgrund der geringen Größe der ersten Larvenstadien Wägefehler einen relativ großen Einfluss auf die Ergebnisse haben, wurde parallel zur gravimetrischen Methode, die Fettbestimmung mit der Sulpho-Phospho-Vanillin Reaktion etabliert. Dazu werden die Tiere homogenisiert und die Lipide mit einem Chlorophorm-Methanol Gemisch extrahiert. Nach vollständigem Verdampfen der Lösungsmittel im Wasserbad wird konzentrierte Schwefelsäure zugegeben und die Lösung nochmals für 10 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wird anschließend ein Phosphorsäure-Vanillin-Gemisch zugegeben, dass eine charakteristische Rotfärbung verursacht. Anschließend erfolgt die Extinktionsmessung bei 530 nm im Photometer. Durch die Kalibrierung mit bekannten Lipidmengen soll der Fettgehalt auch für sehr kleine Einzeltiere bestimmbar sein (VAN HANDEL, 1985; ZÖLLNER & KIRSCH, 1962).

Mit den aus den Temperaturversuchen gewonnenen adulten Käfern wurden Untersuchung über den Einfluss der Temperatur bzw. Besiedlungsdichte auf die Produktion von Eiern durchgeführt. Hierfür wurden die zur Verfügung stehenden Weibchen unmittelbar nach dem Schlupf in Einzelhaltung isoliert und mit einem unter gleichen Bedingungen angezogenen Männchen verpaart. Die Anzahl aller in einem Zeitraum von 9 Tagen bei 20°C in den mit Sand gefüllten Petrischalen abgelegten Eier wurde durch Auswaschung bestimmt.

TA 6 – Die Versuche zur Wirtsfindung der Larven wurden zuerst mit Tieren des nicht-diapausierenden Laborstamms durchgeführt.

Zu prüfen/erproben war:

- der genereller Ablauf von Pflanzen- und Larven-Anzucht,
- eine konsistente Befüllung der Laufrinnen (Dichte und Feuchtigkeit),
- der Besatz und die Auflösung/Extraktion der Larven und
- die Bestimmung einer optimalen Versuchsdauer.

Für die Versuche wurden die Larven in Erde an Maiskeimlingen bis zum frühen dritten Stadium angezogen. Die Testpflanzen (Mais, cv. Tassilo, *Sorghum bicolor*, cv. Goliath und *S. bicolor x sudanense*, cv. Inka) wuchsen bis BBCH 13–14 in einem 2:1 (vol.) Erdgemisch aus Pikier-Erde und gedämpfter Feld-Erde. Drei Tage vor dem geplanten Larven-Besatz wurden die Laufrinnen mit dem gleichem Gemisch befüllt und je eine Test-Pflanze am Ende der Rinnen eingesetzt. Um Feuchtigkeitsverlusten vorzubeugen, können die Rinnen mit einem passenden Deckel verschlossen werden. Pro Versuchsvariante wurden in der Mitte jeder Rinne 20 Larven freigelassen. Dazu wurden je zwei Tiere mit einem Pinsel in ein 2–3 cm tiefes Loch überführt und wieder mit Erde bedeckt. Zur Bestimmung der optimalen Versuchsdauer erfolgte die Auflösung der Teilversuche nach sechs, 24 und 48 h. Für die Extraktion wurden die Laufrinnen in acht Teilabschnitte von je 14,5 cm unterteilt und die darin enthaltenen Larven mittels Hitzeextraktion (modifizierte MacFadyen-Anlage) ausgetrieben.

Die Weiterführung der Versuche der TA 6 erfolgte in enger Absprache mit den bodenkundlichen Mitarbeitern der Agrar- und Umweltwissenschaftliche Fakultät der Universität Rostock (AG Prof. Dr. Leinweber). Dabei stellte sich heraus, dass die angestrebten Untersuchungen zum Einfluss der Bodenfeuchte und -dichte kaum zu standardisieren sind und schon geringe Abweichungen zu stark variierenden Ergebnisse führen. Weiterhin zeigten Messungen mit dem Massenspektrometer, dass die Detektion von Lockstoffen in Böden durch bodeneigene Signale überlagert und beeinträchtigt wird. Deshalb wurde ein inertes System etabliert, in dem Glaskugeln anstelle von Boden Verwendung fanden. Hierdurch wurde sowohl die Bewegung

der Larven, als auch das Wachstum von Test-Pflanzen ermöglicht. Als Lauf-Rinnen wurden verschieden große Acrylglas-Behälter (30 x 15 x 2,0; 30 x 11 x 2,5) konstruiert und verschiedene Kugeldurchmesser (0,8–1,0; 1,3–1,7 und 3,0 mm) geprüft. Für die Erfassung des „Hintergrundrauschens“ des Systems erfolgten massenspektrometrische Messungen an der Universität Rostock.

Samen der Pflanzen, die für die Untersuchungen mit dem Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometer (MS, Py-FIMS) und Gaschromatographen (GC) vorgesehen waren, wurden oberflächlich mit Natriumhypochlorid sterilisiert (siehe oben). Dennoch konnten nicht alle Versuchsansätze frei von Pilzinfektionen gehalten werden und mussten teilweise wiederholt werden. Für problematisches Saatgut (z.B. Mais) wurden weitere Sterilisationsmethoden getestet. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte hydroponisch mit einer Hoagland-No.2 Lösung (Salz-Nährlösung; Sigma-Aldrich: H2395, LOT: RNBB2884; 1,6 g/l, Zusammensetzung siehe Tab. 3) in Glasperlen (3 mm Durchmesser).

Tab. 3: Chemische Zusammensetzung von Hoagland's No. 2 Lösung.

Nährsalz	C mg/l	Summenformel	CAS Nr.
Ammonium Phosphat	115,03	(NH ₄) ₃ PO ₄	10361-65-6
Borsäure	2,86	B(OH) ₃	10043-35-3
Calciumnitrat	656,40	Ca(NO ₃) ₂	10124-37-5
Kupfersulfat * 5 H ₂ O	0,08	CuSO ₄	7758-98-7
Eisentartrat* 2 H ₂ O	5,32	Fe ₂ (C ₄ H ₄ O ₆) ₃	87-69-4
Magnesiumsulfat	240,76	MgSO ₄	15553-21-6
Manganchlorid * 4 H ₂ O	1,81	MnCl ₂	7773-01-5
Molybdentrioxid	0,02	MoO ₃	1313-27-5
Kaliumnitrat	606,60	KNO ₃	7757-79-1
Zinksulfat * 7 H ₂ O	0,22	ZnSO ₄	7733-02-0

Andere, ebenfalls genutzte Nährlösungen erwiesen sich als problematisch, da die hohen Konzentrationen einiger Salze zwar das Wachstum der Pflanzen förderten, aber zu starke Signale bei den nachfolgenden Messungen verursachten und die Permeabilität der Sonden nachhaltig negativ beeinflussen. Neben den Untersuchungen der chemischen Zusammensetzung der Wurzel-Exsudate wurden auch Versuchsansätze zur Detektion gasförmiger Lockstoffe bzw. flüchtiger Bestandteile im Porenraum geprüft. Dazu wurden für die bereits vorhandenen Laufrinnen (LR) dicht schließende Deckel konstruiert und spezielle keramische Saugkerzen genutzt.

Aus den LR-Versuchen wurden jeweils zwei Ansätze mit den Varianten (1) Mais ohne Larven (Kontrolle) und (2) Mais mit Larven für eine molekular-chemische Charakterisierung durch massenspektrometrische Verfahren genutzt. Die molekular-chemischen Untersuchungen waren in drei Arbeitsschritte untergliedert: (1) unspezifisches Screening der Rhizodepositionen (Wurzelexsudate) mit Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie (Py-FIMS), (2) Verifizierung der unter (1) erzielten Analyseergebnisse durch komplementäre Analysen mittels Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC/MS) und Fourier-Transformation Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometrie (FT-ICR-MS) und (3) Machbarkeitsstudie zur Detektion volatiler, unter Umgebungstemperaturbedingungen (20°C) gasförmiger Substanzen im Porenraum durch Felddesorption Massenspektrometrie.

Die Py-FIMS-Messungen erfolgten an zwei doppelt-fokussierenden Sektorfeld-Massenspektrometern (Finnigan MAT95 und MAT900). Für die Analysen wurden die wässrigen Probenlösungen lyophilisiert. Das Probenmaterial repräsentiert in erster Linie Wurzelexsudate. Zudem wurden die Wurzeln und *Diabrotica*-Larven, die von den Wurzeln nach Versuchsende separiert werden konnten, einem Screening durch Py-FIMS unterzogen. Die Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie zeichnet sich durch eine temperaturo aufgelöste Verflüchtigung (im Hochvakuum) der Substanzen im komplexen Stoffgemisch im Temperaturbereich von 50 bis 700°C aus. Im Bereich 50 bis 300°C dominiert die Thermodesorption, während bei Temperaturen >300°C eine Freisetzung von Molekülen durch

Pyrolyse erfolgt. Durch das massenspektrometrische Screening wurden Massensignale im m/z -Bereich 15 bis 900 Th erfasst. Als Temperaturschrittweite wurden 10 K gewählt (entspricht 66 Scans). Die Scangeschwindigkeit pro Dekade betrug 10 sec. Unter Berücksichtigung der Ausheizzeit des Feldionisation-Emitters (Interscan-Heating) zwischen den einzelnen Scans von 2 sec, ergab sich eine Gesamtanalysenzeit von ca. 22 Minuten.

Bei der temperaturlösenden Py-FIMS ergaben sich probenbedingt methodische Besonderheiten. Aufgrund hoher Salzfrachten, die zu Störungen während der Messung führten und ein häufigeres Reinigen der Ionenquelle erforderten, mussten Kompromisse in der Probenaufbereitung und der Anzahl der Messwiederholungen eingegangen werden. Eine zunächst geplante direkte Analyse der Exsudate war nicht möglich, da die Konzentrationen organischer Substanzen zu gering waren. Aus diesem Grund erfolgte eine Anreicherung der Organik durch Gefriertrocknung. In Konsequenz wurden anorganische Bestandteile (Salze aus der Nährlösung) ebenfalls aufkonzentriert, was die massenspektrometrische Analyse beeinträchtigte. Eigene langjährige Erfahrungen durch das STZ Soil Biotechnology in der Untersuchung von Rhizodepositionen haben gezeigt, dass eine Entfernung von anorganischen Bestandteilen, z.B. durch Dialyse, zu einer unerwünschten Veränderung der molekular-chemischen Zusammensetzung der Lösungen führt.

In Abb. 4 sind die analytischen Ergebnisse der Py-FIMS für die Proben des ersten Versuchsansatzes dargestellt. So wurden, nach Modifikation des Messprotokolls, die Lyophilisate der Exsudate aus allen vier LR in dreifacher Wiederholung analysiert. In der Abbildung sind die gemittelten und summierten Py-FI-Massenspektren sowie die Thermogramme der Totalionenintensität (TII in 10^6 Counts mg^{-1} Lyophilisat) von jeweils einer Probe mit und ohne Larve dargestellt. Diese repräsentieren charakteristische Py-FI-Daten von Rhizodepositionen. Die Thermogramme der TII zeigen sowohl für die Maispflanzen mit, als auch die ohne Larvenbesatz, zwei Maxima, bei 200 und bei 350°C. Im ersten Temperaturbereich (korrespondierend zum ersten Maximum) wurden in erster Linie Kohlenhydrate und freie Fettsäuren durch Thermodesorption freigesetzt und detektiert, während bei höheren Temperaturen aromatische Verbindungen erfasst worden sind. Generell ist das gemittelte und summierte Massenspektrum repräsentativ für Maispflanzen, die in sterilem Medium angezogen wurden und wird durch Marker- bzw. Indikatoren (m/z) von Kohlenhydraten, Fettsäuren, organischen Säuren und aromatischen Verbindungen dominiert. Das Spektrum der LR A (mit Larve) ist durch ein höheres Vorkommen (% der Totalionenintensität) an m/z -Signalen im Bereich von 200 bis 350 gekennzeichnet.

Eine vertiefte Auswertung des massenspektrometrischen „Patterns“ der Py-FIMS erfolgte durch multivariate Statistik. Dabei werden zunächst die m/z -Signale höchster Diskriminierungskraft durch die Kombination eines univariaten (Wilks' Lambda) und multiplen Tests (F -Test) selektiert. Diese m/z -Signale werden anschließend auf der Basis einer Hauptkomponenten- und/oder Diskriminanzanalyse zur Differenzierung der Probenkollektive genutzt. Am Beispiel des ersten Versuchs belegte die multivariate Statistik signifikante Unterschiede zwischen den Exsudaten. Bei der statistischen Auswertung wurde berücksichtigt, dass an den Wurzeln der Maispflanze in LR C keine Larven zum Versuchsende anhafteten, obwohl hier, wie bei LR A, *Diabrotica*-Larven ausgesetzt wurden.

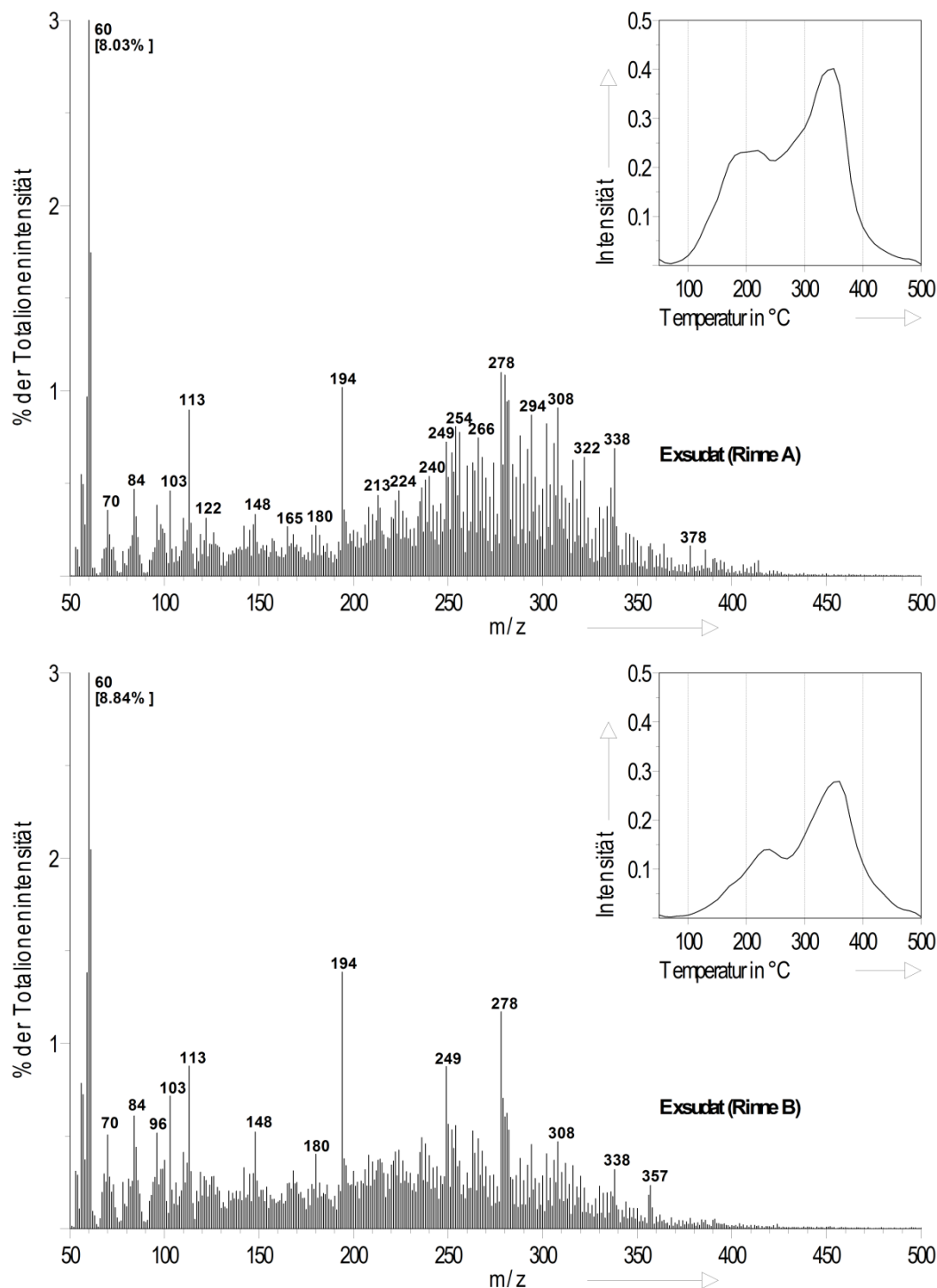


Abb. 4: Thermogramm der Totalionenintensität (oben rechts) und summiertes, gemittelt Py-FI Massenspektrum von gefriergetrockneten Exsudaten von Maispflanzen mit (oben) und ohne *Diabrotica*-Larven (unten).

Zur genaueren Charakterisierung der Bodenlösungen aus den LR-Versuchen und Identifizierung einzelner Verbindungen wurden Messungen mit ultrahochoflösender Fourier-Transformation Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometrie (FT-ICR-MS) durchgeführt. Die FT-ICR-MS-Untersuchungen wurden mit dem Gerät solarix (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany), das mit einem 7-Tesla-Magneten (Bruker BioSpin S.A.S, Wissembourg, France) ausgerüstet ist. Die lyophilisierten Proben wurden in verschiedenen Lösungsmitteln und Gemischen (z.B. Methanol und Wasser) rückgelöst. Die Probenlösungen wurden mit einer Kolbenpumpe bei $120 \mu\text{L min}^{-1}$ in die Elektrospray-Ionisations (ESI)-Quelle gepumpt.

Verschiedene Geräteparameter der Quelle und der Transferoptik wurden für diesen speziellen Probenatz optimiert. Die bis zu 1000 einzelnen aufgenommenen Massenspektren wurden für jede Probe summiert wobei eine Massengenauigkeit < 0.2 mTh (1 ppm) und eine Auflösung bis zu 1.000.000 erreicht wurden.

Parallel zu den Messungen an der Universität Rostock wurden Versuche mit LR durchgeführt, die mit Erde gefüllt waren. In vielen Experimente, die zur Klärung der Wirtsfindung dienten, wurde aus versuchstechnischen Gründen mit dem zweiten Larvenstadium gearbeitet (z.B. HIBBARD & BJOSTAD, 1988, 1990, BJOSTAD & HIBBARD, 1992, HIBBARD et al. 1994). Da es jedoch das frisch geschlüpfte erste Larvenstadium (L1) ist, dass die Wurzel einer Wirtspflanze finden muss, und es häufig physiologische Unterschiede zwischen Entwicklungsstadien gibt, wurden Tests zur Optimierung der Versuchs-Methodik durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Nutzung des ersten Larvenstadiums möglich ist, wenn der Besatz der Larven maximal 12 h nach dem Schlupf erfolgt und die Versuchszeit auf acht Stunden begrenzt wird. Die geringe Größe der Tiere erfordert darüber hinaus eine Extraktionsmethode, bei der die Tiere das Versuchssubstrat aktiv verlassen. Dafür eignen sich optimal Kempfen- oder MacFadyen-Geräte, die durch die Erzeugung eines Wärme- und Feuchtigkeits-Gradienten die Tiere zum Verlassen des Substrats ‚bewegen‘. In weiteren Versuchen musste die zu nutzende Temperatur so optimiert werden, dass die Larven die Bodenprobe verlassen, bevor sie durch Nahrungsmangel entkräftet sind, aber gleichzeitig nicht durch einer zu starke Ausprägung der Gradienten geschädigt werden. Die Versuche zeigten auch, dass zwischen dem zu extrahierenden Volumen der Bodenprobe und dem prozentualen Anteil der wiedergefundener (extrahierter) Larven ein enger indirekter Zusammenhang besteht ($y=-23,3x+112,2$; $R^2 = 0,96$; Abb. 5).

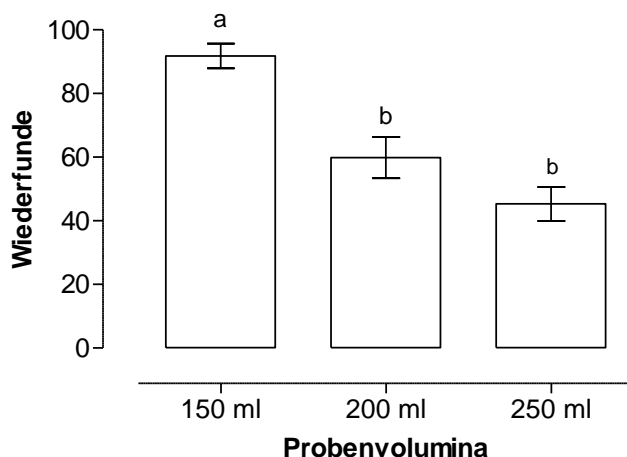


Abb. 5: Mittlerer prozentualer Anteil (\pm SD) extrahierter *Diabrotica*-Larven in Abhängigkeit des Probenvolumens (48 h Extraktion bei 40 °C in einer modifizierten MacFadyen-Anlage, unterschiedliche Buchstaben – signifikante Unterschiede, ANOVA, Tukey post hoc test, $p < 0,05$).

Das Aussammeln der L₁ aus den Auffanggefäßen des MacFadyen-Geräts erfolgte nach Spülung der Proben durch ein 63 µm Sieb mit einem Auflichtmikroskop (SZ-60, Olympus). Aus dem in Abb. 4 dargestellten Zusammenhang ergab sich, dass die für die ersten Versuche konstruierten LR zu groß dimensioniert waren. Diese wurden deshalb durch den Einbau von zusätzlichen Mittelwänden in vier kleine Rinnen (Teilrinnen, TR) unterteilt (Abb. 6). Die TR (A–D) sind jeweils 49 cm lang, 4,5 cm breit und in sieben gleich große Abschnitte gegliedert. Um möglichst viele der eingesetzten Larven extrahieren zu können, wurden die Rinnen nur bis zu einer Höhe von 6 cm mit dem Versuchsboden aufgefüllt. Daraus ergaben sich ein Probenvolumen von $\approx 190 \text{ cm}^3$ je Abschnitt. Die Inokulation von je 50 frisch geschlüpfte L1 je TR erfolgte immer im zentralen vierten Abschnitt. Die Versuchsvarianten, z.B. Testpflanzen, befanden sich an den beiden Enden der Rinnen in den Abschnitten 1 und 7. Um das Wurzelwachstum von Testpflanzen auf diese Abschnitte zu begrenzen, wurden diese bis zwei Tage vor dem geplanten Versuch mit Metallblechen eingefasst.

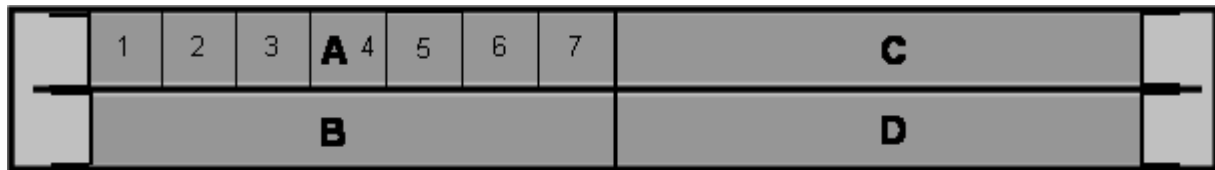


Abb. 6: Laufrinne für Wahl-Versuche mit dem ersten Larvenstadium des Westlichen Maiswurzelbohrers. (A–D Teilrinnen; 1–7 Rinnen-Abschnitte $a \approx 190 \text{ cm}^3$, die Inokulation jeder Rinne erfolgt im zentralen vierten Abschnitt, Testpflanzen werden in den Abschnitten 1 bzw. 7 angezogen)

Zur Abschätzung der Zeit (Versuchsdauer) die die Larven benötigen, um sich vom Abschnitt 4 zu einer Maispflanzen zu bewegen, wurden Versuche durchgeführt, in denen nur an einer Seite der Rinne eine Maispflanze positioniert wurde. Jeweils vier TR wurden 2, 4, 6 und 8 Stunden nach Inokulation der Larven aufgelöst und die Verteilung der Larven in den Rinnen analysiert. Alle weiteren Versuchsvarianten wurden mindestens achtfach wiederholt.

Um die Ergebnisse von BRANSON (1982; L1 können nicht zwischen Wirts- und Nicht-Wirtspflanzen unterscheiden) und BERNKLAU & BJOSTAD (1998; CO_2 ist der einzige Lockstoff, den die Larven zur Wirtsfindung nutzen) zu überprüfen, wurden folgende Pflanzen in den Rinnen gegen Mais (als optimale Wirtspflanze) getestet: Kartoffel (*Solanum tuberosum*, cv. Delikat), Tomate (*S. esculentum*, cv. Hoffmann's Rentita), Knautgras (*Dactylus glomerata*) und Weiche Trespe (*Bromus mollis*). In vorausgehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich die Kartoffel, Tomate und Trespe nicht als Wirtspflanzen eignen. Am Knautgras entwickelten sich die Larven dagegen gut. Weitere Versuchsvarianten, mit denen zum Teil versuchstechnische Fragestellungen untersucht werden, waren leere Rinnen, Mais gegen Mais und Mais gegen Mais mit *Diabrotica*-Larven.

TA 7 – Mit den Versuchen zur Hungerfähigkeit der Larven wurde 2011 begonnen. Als Testcontainer fanden 150 ml Rotilabo-Gefäße Verwendung deren Boden mit einer Aktivkohle-Gips-Mischung (1 cm hoch) bedeckt war. Diese Bodenbedeckung wurde genutzt, um die Larven ohne Futter zu halten, aber durch Zugabe von Wasser vor Austrocknung zu bewahren. Larven wurden innerhalb von 24 h nach dem Schlupf gewogen und einzeln in die Testcontainer überführt. Die Hungerperiode erstreckte sich über 0, 1, 2, 3 und 4 d. Nach Ablauf der Hungerperiode wurden die Tiere erneut gewogen und anschließend durch Zugabe von Maiskeimlingen (cv. Tassilo) gefüttert. 2 d nach Beginn der Fütterung wurden die Tiere erneut gewogen. Vor jeder Wägung erfolgte die Bestimmung der Mortalität der Larven.

3. Ergebnisse

Die thematische und organisatorische Abstimmung mit Kollegen des BLE und JKI (TA 1) wurde seit Projektbeginn kontinuierlich durchgeführt und bildete mit der erfolgreichen Anzucht von Futterpflanzen für die Zuchten und Versuche (TA 2) die Grundlagen für Bearbeitung des Projektes.

TA 3 – Der Larvenschlupf der beiden europäischen Herkünfte begann synchron mit einem Ei-Alter von 66 Tagen. Ab einem Alter von etwa 75 d schlüpfen von der ungarischen Herkunft prozentual mehr Tiere je Zeiteinheit (unterschiedlicher Anstieg der Kurven, s. Abb. 7). Die bis zum Versuchs-Ende erfasste mittlere Schlupfrate \pm SD der Eier aus Ungarn ist mit $77,2 \pm 9,4 \%$ signifikant größer als die der italienischen Herkunft ($44,3 \pm 11,6\%$; Mann Whitney-Test; s. Abb. 8).

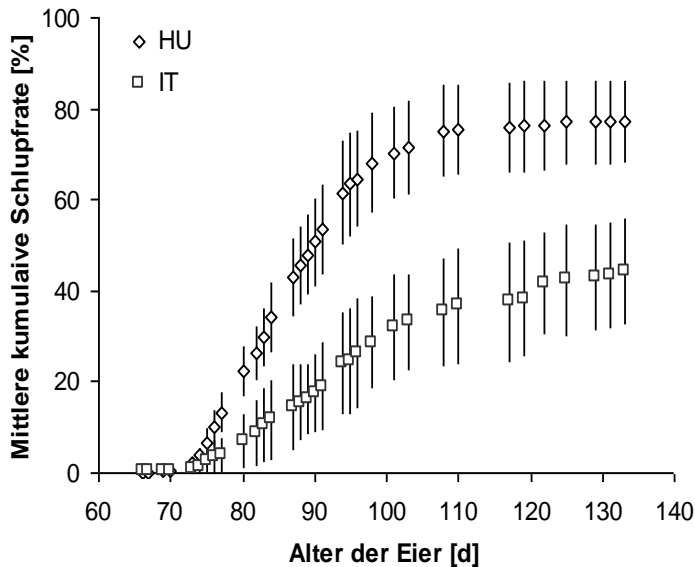


Abb. 7: Kumulative Schlupfrate (\pm SD) ungekühlt gelagerter Eier einer italienischen (IT) und einer ungarischen (HU) Herkunft.

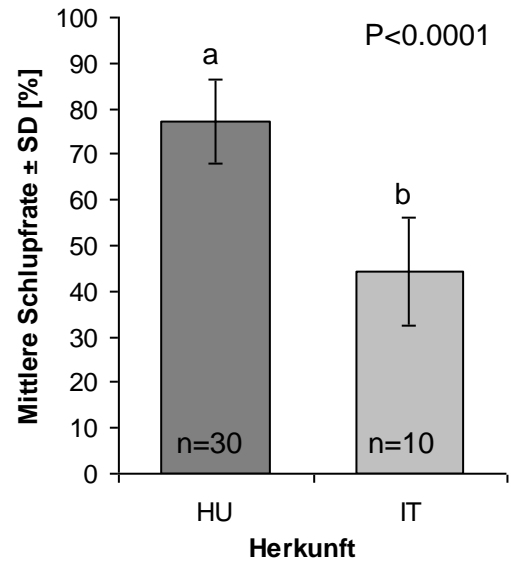


Abb. 8: Mittlere Schlupfrate (\pm SD) beider Herkünfte. $P < 0.0001$

TA 4 – Durch den starken Pilz- und Bakterienbefall der Eier konnten zu Beginn des Vorhabens nur Schlupfraten von maximal 35 % registriert werden. In einigen Wiederholungen schlüpften gar keine Larven. Da üblicherweise Raten von 70–80 % erreicht werden und davon auszugehen ist, dass der Befall nicht nur die Schlupfrate, sondern auch die Entwicklungsgeschwindigkeit der Larven beeinflusst, werden diese Ergebnisse nicht berücksichtigt.

Bei der Prüfung wirksamerer Desinfektionsmethoden und -mittel galt es, eine optimale Kombination aus Wirkstoff, Konzentration und Einwirkzeit zu bestimmen. Einige Mittel, z. B. Formalin, besaßen auch in geringen Konzentrationen eine gute Wirksamkeit gegen Bakterien und Pilze, reduzierten aber die Schlupfrate der Eier. Auf Basis von Literaturangaben und eigenen Experimenten konnte die Desinfektion der Ei-Oberfläche jedoch so weit verbessert werden, dass die Versuche 2011 erfolgreich durchgeführt werden konnten.

Für einige *Diabrotica*-Linien mussten neue Zuchtansätze etabliert werden. Besonders Erfolg versprechend erschien auch die Etablierung einer zweiten Methode (nach JACKSON & ELLIOT, 1988). Hierbei werden bereits die Eier (wenn die Kopfkapsel der noch nicht geschlüpften Larven durch das Chorion erkennbar ist) in Petrischalen an die Wurzeln junger Testpflanzen-Sämlinge überführt.

Der Schlupf im ungarischen und italienischen Stamm begann nach 66 Tagen, 50% der Eier schlüpft im ungarischen Stamm nach 90 Tagen und im italienischen nach mehr als 133 Tagen. Das Ende des Schlupfes konnte nicht erfasst werden, da die Versuche wegen der stark zunehmenden Verpilzung der Eier nach 140 Tagen abgebrochen wurden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen über die Entwicklung morphologischer/morphometrischer Merkmale der Tiere des nicht-diapausierenden Stamms während der post-diapausalen Entwicklung bei 20°C sind in Tab. 4 dargestellt.

Tab. 4: Daten der post-diapausalen Entwicklung (Mittelwert \pm SD)

Extraktion	Extrahierte Tiere (n)	Alter (d)	Entwicklungsindex	Kopfkapselbreite (μm)	Trockengewicht (mg)
1	126	4,6 \pm 0,7	1,0 \pm 0,2	239,7 \pm 27,2	0,117 \pm 0,026
2	154	7,7 \pm 0,9	2,0 \pm 0,3	359,4 \pm 39,2	0,178 \pm 0,080
3	169	11,1 \pm 0,4	2,1 \pm 0,3	394,6 \pm 48,3	0,561 \pm 0,143
4	178	14,0 \pm 0,1	2,9 \pm 0,3	531,8 \pm 45,9	0,993 \pm 0,474
5	175	15,2 \pm 0,4	3,0 \pm 0,2	537,2 \pm 26,4	1,615 \pm 0,742
6	83	17,0 \pm 0,0	3,2 \pm 0,4	543,1 \pm 22,9	

Entwicklungsindex: Mittelwert der Entwicklungsstadien ($L_1=1$, $L_2=2$, $L_3=3$, Vorpuppe=4, Puppe=5)

TA 5 – Für die Versuche zur Entwicklung der Larven war die Nutzung von Klimakammern essentielle Voraussetzung. Die ReglunGS-Stabilität der Kammern wurde mit Data-Loggern aufgezeichnet (Escort, iLog). Logger mit externen Messfühlern erlaubten die Temperaturerfassung im Boden der Töpfe, so dass eine exakte Dokumentation der Temperatursummen möglich ist.

Die ersten Versuche zeigen, dass die KKB der einzelnen Entwicklungsstadien nicht überlappende Gruppen bilden (Abb. 9, 10). Eine Ausnahme sind die Vorpuppen, die sich als späte L_3 aufgrund ihrer gekrümmten Form zwar von „normalen“ L_3 trennen lassen, deren Entwicklung aber keine Häutung vorausgeht. Daher sind diese beiden Stadien auf Basis der KKB nicht zu unterscheiden. Die klare Trennung der einzelnen Entwicklungsstadien (L_1 – L_3) deutet darauf hin, dass die KKB ein stark konserviertes, wenig variables Merkmal ist und sich daher nicht als Merkmal zur Einschätzung der Fitness von Larven eignet. Andererseits zeigen Ergebnisse aus parallel durchgeführten Versuchen (Eignung von Energiepflanzen als alternative Nahrungspflanzen von *D. v. virgifera*, koordiniert durch die LfL Bayern), dass die KKB durch äußere Einflüsse (z. B. Nahrungsqualität) beeinflusst werden.

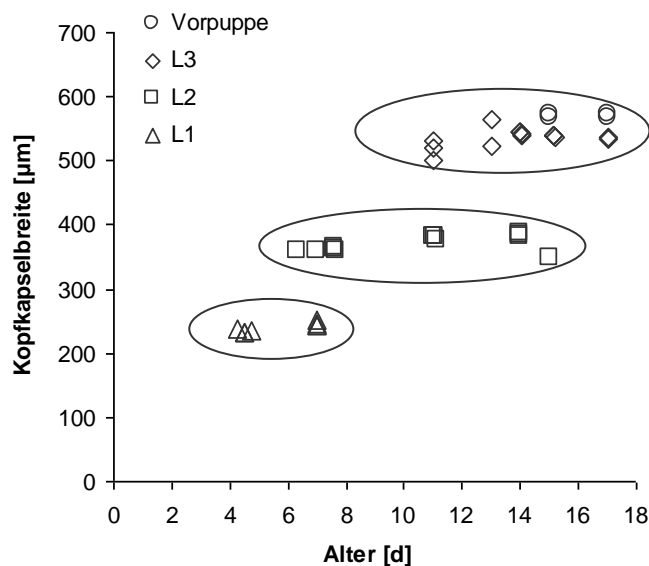


Abb. 9: Mittlere Kopfkapselbreiten unterschiedlich alter Larven des nicht-diapausierenden Laborstamms bei 20 °C.

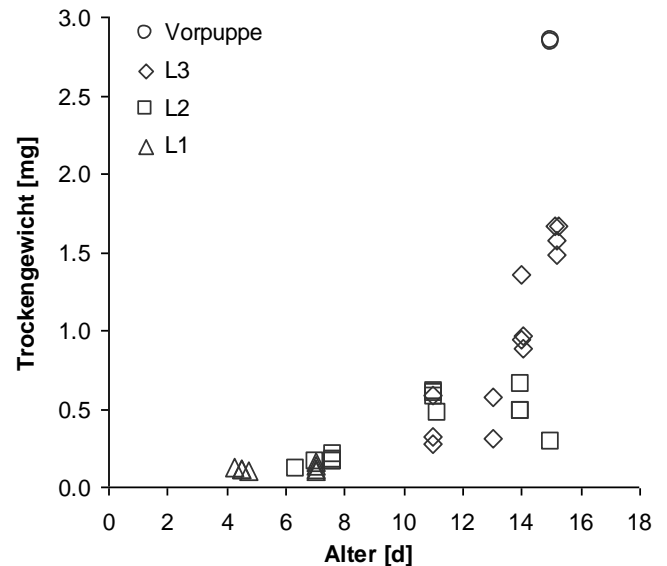


Abb. 10: Mittleres Trockengewicht unterschiedlich alter Larven des nicht-diapausierenden Laborstamms bei 20 °C.

Die Gewichte der einzelnen Larvenstadien überlappen sich erwartungsgemäß deutlich und entwickeln sich mit zunehmendem Alter exponentiell (Abb. 10). Der Zusammenhang zwischen Feucht- und Trockengewicht ist sehr eng ($R^2=0.98$, Kurve nicht dargestellt). Trotz des Aufwands der Trocknung (bis zur Gewichtskonstanz) ist eine exakte Bestimmung des Trockengewichts

technisch einfacher als die Wägung feuchter Tiere („Gewichtsabnahme“ durch Verdunstung). Die Gewichtsbestimmung wurde deshalb generell mit getrockneten Tieren durchgeführt.

Die Korrelation von KKB und Trockengewicht (Bestimmtheitsmaß $R^2=0,85$) deutet ebenfalls auf einen engen, exponentiellen Zusammenhang zwischen den erhobenen Parametern hin (Abb. 11 & 12). Hieraus ergibt sich eventuell die Möglichkeit, in zukünftigen Untersuchungen den Aufwand für die Bewertung der Larvenfitness zu reduzieren.

Das Trockengewicht der Larven nimmt in Abhängigkeit von der Temperatur unterschiedlich zu. Bei 15°C erreichten die Larven des nicht-diapausierenden Stamms das größte Gewicht nach mehr als 70 d, wofür sie bei 25°C weniger als 15 d benötigten (Abb. 13). Bei 20°C war das Gewicht der Larven dieses Stamms größer als bei 15°C. Eine höhere Besiedlungsdichte der Larven induzierte etwas höhere Trockengewichte, die sich aber zum Ende des Versuchs nicht mehr unterschieden.

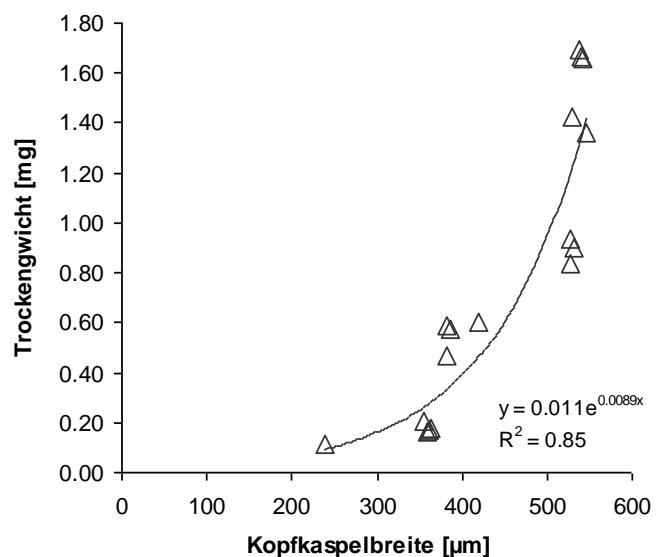


Abb. 11: *D. v. virgifera*, erstes und zweites Larvenstadium mit unterschiedlich breiten Kopfkapseln.

Abb. 12: Korrelation zwischen KKB und Trockengewicht von Larven des nicht-diapausierenden Laborstamms bei 20 °C.

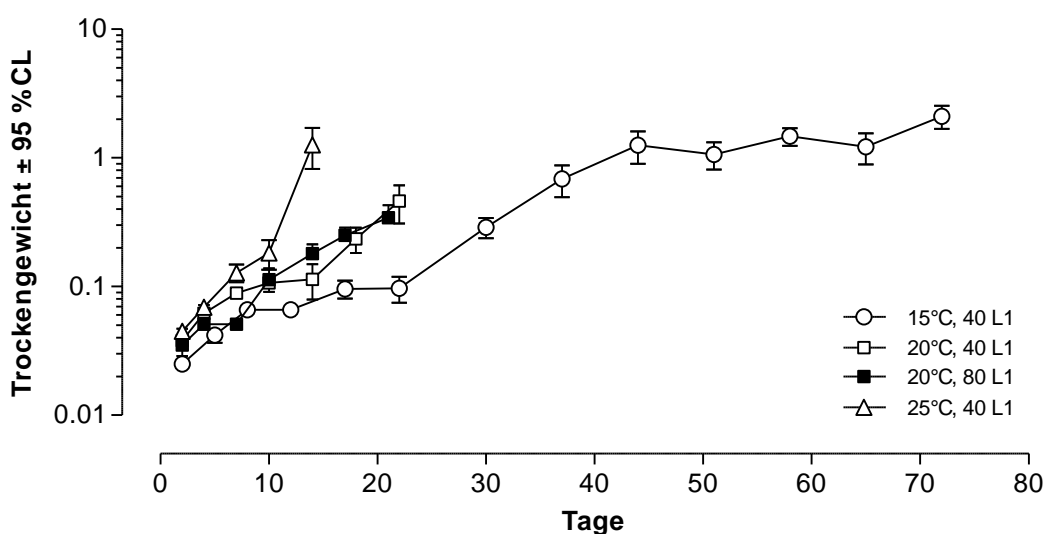


Abb. 13: Entwicklung des Trockengewichts (mg) von *Diabrotica*-Larven des nicht-diapausierenden Labor-Stamms, gehalten bei unterschiedlichen Temperaturen und Populationsdichten.

Bei 20°C erreichten die Larven des diapausierenden Stamms aus Ungarn das größte Gewicht nach etwas mehr als 20 d (Abb. 14). Das Gewicht der Larven des Stamms war bei 25°C größer, wenn gleiche Entwicklungszeiten verglichen werden. Durch kürzere Versuchsdauer erreichten diese Larven aber nicht das Maximalgewicht wie bei 20°C. Bei 15°C blieben die Larven auch nach mehr als 60 d leichter als bei 20 und 25°C. Eine höhere Besiedlungsdichte der Larven induzierte nach 10 d bis zum Ende des Versuchs etwas geringere Trockengewichte.

Wird die Entwicklung der Trockengewichte in Relation zu den Larvenstadien betrachtet, lässt sich unabhängig von der Herkunft ein exponentielles Wachstum erkennen (Abb. 15, 16). Während das 3. Larvenstadium des ungarischen Stamms das größte Gewicht bei 20°C erreicht, haben die Tiere des nicht-diapausierenden Stamms in diesem Entwicklungsstadium das größte Gewicht bei 20°C. Es muss dabei beachtet werden, dass die Larven auch innerhalb eines Entwicklungsstadiums an Gewicht zunehmen, das gemessene Gewicht also je nach Messzeitpunkt variieren kann.

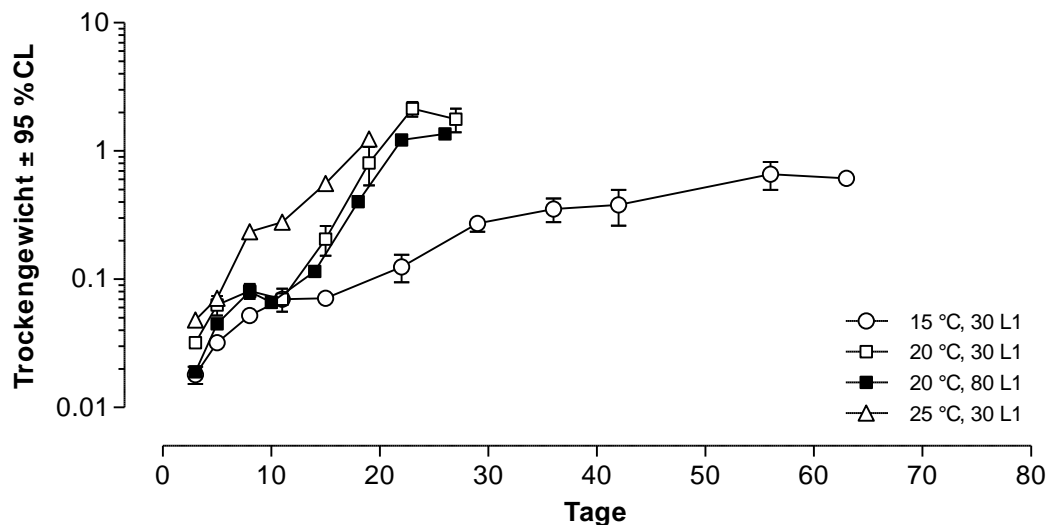


Abb. 14: Entwicklung des Trockengewichts (mg) von *Diabrotica*-Larven des Stamms aus Ungarn, gehalten bei unterschiedlichen Temperaturen und Populationsdichten.

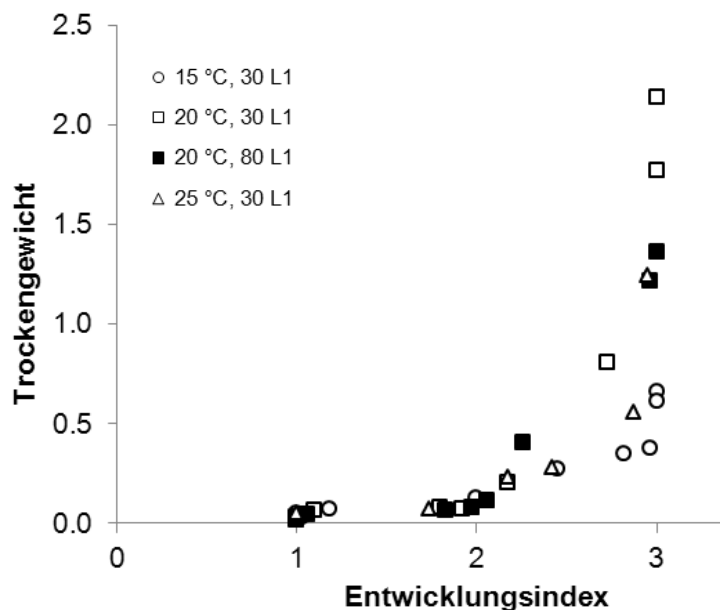


Abb. 15: Einfluss der Temperatur (°C) und der Besiedlungsdichte auf das Trockengewicht (mg) der Larven des ungarischen Feld-Stamms in Bezug zum Entwicklungsindex.

(Entwicklungsindex: Mittelwert der Entwicklungsstadien ($L_1=1$, $L_2=2$, $L_3=3$, Vorpuppe=4, Puppe=5))

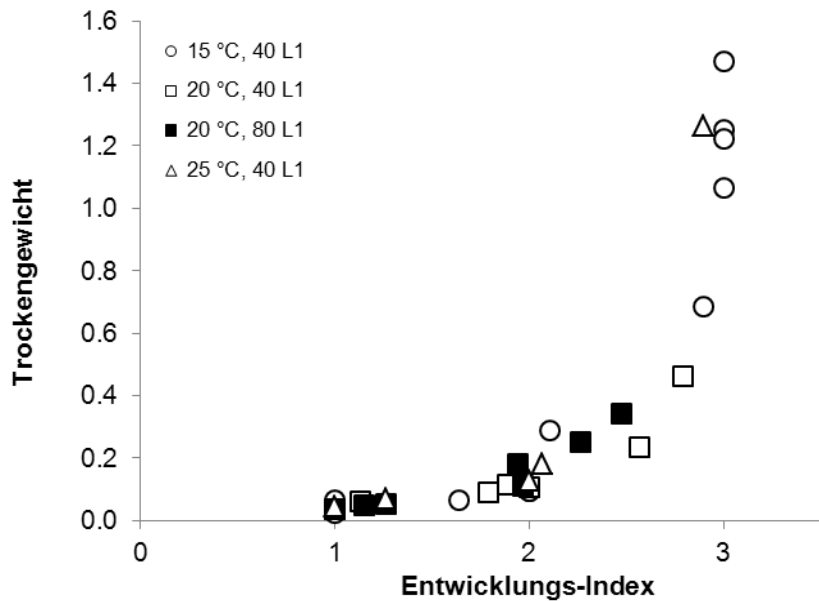


Abb. 16: Einfluss der Temperatur ($^{\circ}\text{C}$) und der Besiedelungsdichte auf das Trockengewicht (mg) der Larven des nicht-diapausierenden Labor-Stamms in Bezug zum Entwicklungsindex. (Entwicklungsindex: Mittelwert der Entwicklungsstadien ($L_1=1$, $L_2=2$, $L_3=3$, Vorpuppe=4, Puppe=5))

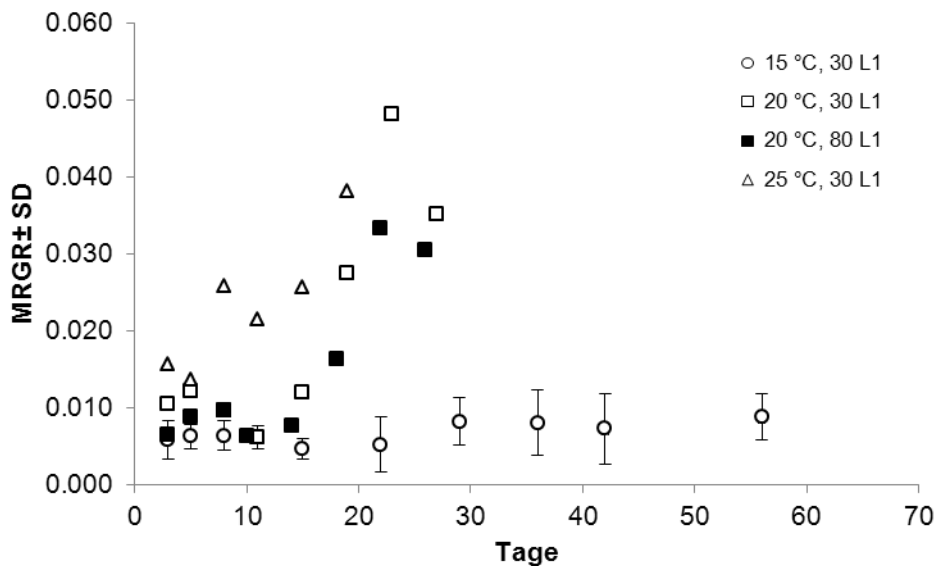


Abb. 17: Einfluss der Temperatur ($^{\circ}\text{C}$) und der Besiedelungsdichte auf den mittleren relativen Gewichtszuwachs (MRGR) der Larven des ungarischen Feld-Stamms.

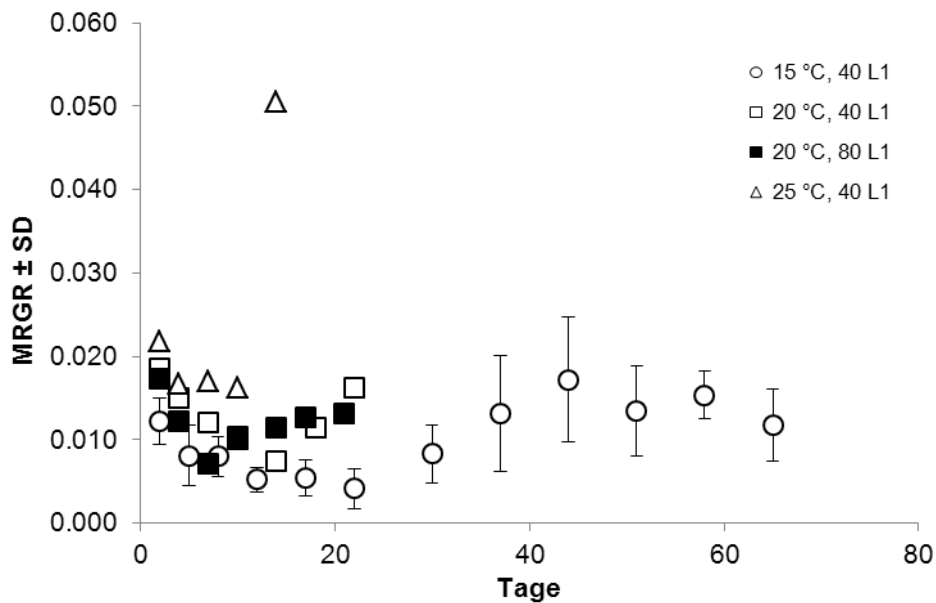


Abb. 18: Einfluss der Temperatur (°C) und der Besiedlungsdichte auf den mittleren relativen Gewichtszuwachs (MRGR) der Larven des nicht-diapausierenden Labor-Stamms.

Um die Abhängigkeit des Gewichts von der Zeit zu kompensieren wurde von FISHER (1921) die „mittlere relative Zuwachsrate“ eingeführt. Zur Charakterisierung der biologischen Leistung wird hierfür für eine bestimmtes Entwicklungsstadium das Gewicht (Gewicht 1) bestimmt. Nach Erreichen des nächsten Entwicklungsstadiums (=Entwicklungsdauer D) werden die Tiere erneut gewogen (Gewicht 2). Aus diesen Parametern wird die mittlere relative Wachstumsrate berechnet

$$\text{MRGR} = (\log \text{Gewicht 1} - \log \text{Gewicht 2}) / D$$

Die mittlere relative Zuwachsrate MRGR entspricht dem Gewichtszuwachs je Zeiteinheit und charakterisiert den Einfluss der Haltungsbedingungen (z.B. die Futterqualität der Wirtspflanze) für eine definierte Tierart.

Der Einfluss von Temperatur und Besiedlungsdichte auf den MRGR der Larven beider Stämme ist in den Abb. 17 und 18 dargestellt. Den größeren Gewichtszuwachs zeigen die Larven des ungarischen Stamms. Lediglich bei 15°C haben die Larven des nicht-diapausierenden Labor-Stamms einen größeren MRGR.

Die Kopfkapselbreite wird genutzt, um die verschiedenen Larvenstadien zu separieren. Geringe Unterschiede lassen sich zwischen den Kopfkapselbreiten von Larven des nicht-diapausierenden Labor-Stamms und des ungarischen Feld-Stamms darstellen (Abb. 19).

Vergleiche der eigenen Werte mit den publizierten Werten zeigen, dass die morphometrischen Daten der Larven des italienischen Stamms denen des nicht-diapausierenden Stamms entsprechen (Tab. 6). Die Larven dieser Stämme haben deutlich breitere Kopfkapseln als die ungarischen Tiere. Es sei aber auch erwähnt, dass nach AGOSTI et al. (2009) die Kopfkapselbreite abhängig sein könnte von der Futterversorgung. Sie kamen nach Auswertung ihres umfangreichen Materials zu der Schlussfolgerung, dass in Jahren mit reichen Niederschlägen die Larven größere Kopfkapselbreiten besitzen und führen dies auf die vermutlich bessere Futterversorgung zurück.

In unseren Versuchen zeigten die Larven des nicht-diapausierenden Stamms in allen Entwicklungsstadien größere Kopfkapselbreiten (Abb. 20-22). Innerhalb der Versuche mit dem 1. Larvenstadium dieses Stamms ließen sich keine Effekte der Temperatur nachweisen. Das 2. Larvenstadium dieses Stamms entwickelte bei 20 und 25°C breitere Kopfkapseln als bei 15°C. Das 3. Larvenstadium dieses Stamms entwickelte hingegen bei 15 und 25°C breitere Kopfkapseln als bei 20°C. Die Erhöhung der Besiedlungsdichte induziert jedoch keinen Effekt auf die Kopfkapselbreite der Larven des nicht-diapausierenden Stamms. Im Gegensatz dazu

sind die Kopfkapselbreiten des 2. und 3. Larvenstadiums des ungarischen Stamms bei 20 und 25°C größer (Abb. 21, 22). Für das 1. und 2. Larvenstadium dieses Stamms induzierte eine höhere Besiedlungsdichte die Bildung schmalere Kopfkapseln.

Die sich aus den Larven dieses Versuchs entwickelten adulten Käfern konnten für weitere Untersuchungen genutzt werden. Bestimmt wurden das Feuchtgewicht und ausgewählte Größenparameter der geschlüpften Männchen und Weibchen: Elytrenlänge, Pronotumbreite, Kopfkapselbreite und Länge der hinteren Tibia (Tab. 7).

Zwischen dem Gewicht der Larven und der adulten Käfer ließen sich direkte Zusammenhänge nachweisen. Da sich im nicht-diapausierenden Stamm die größeren Larven entwickelten, bildeten diese dann die größeren adulten Käfer, die auch eine höhere Fruchtbarkeit besaßen. Von den Tieren aus dem nicht-diapausierenden Stamm wurden die meisten Eier abgelegt. Unter Berücksichtigung aller Paare (also auch derjenigen, in denen die Weibchen vor Ablauf der Versuchsdauer starben) hatten die Käfer, die sich bei 20°C entwickelten, die höchste Fruchtbarkeit (615 Eier/Weibchen), gefolgt von den bei 25°C herangewachsenen Adulten (484 Eier/Weibchen). Die sich bei 15°C entwickelnden Käfer zeigten die geringste Fruchtbarkeit (372 Eier/Weibchen).

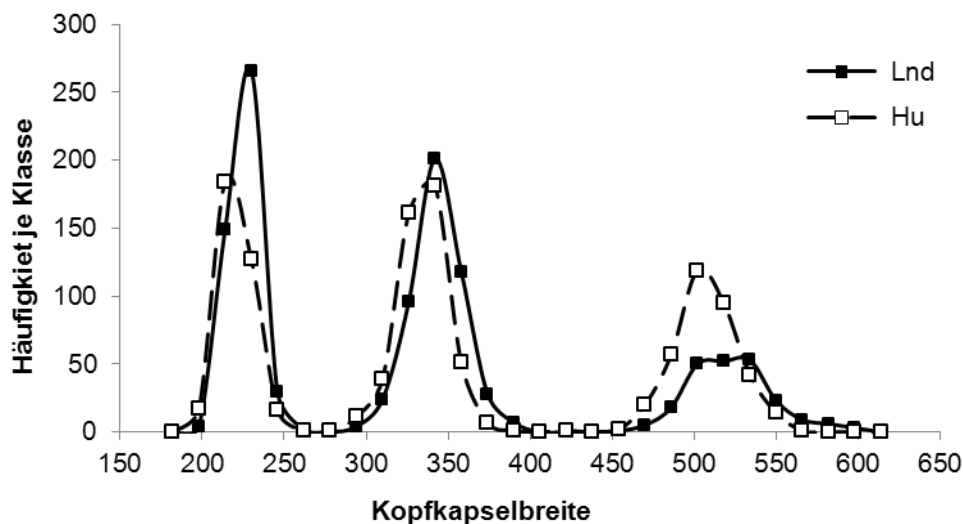


Abb. 19: Verteilung der Kopfkapselbreiten (μm) von *Diabrotica*-Larven des nicht-diapausierenden Labor-Stamms (Lnd) und des ungarischen Feld-Stamms (Hu).

Tab. 6: Kopfkapselbreite (μm) von *Diabrotica*-Larven des nicht-diapausierenden Laborstamms (Lnd) und des ungarischen Feld-Stamms, sowie Angaben anderer Autoren.

Stadium	Eigene Untersuchungen		Agosti et al. (2009)	George & Hintz (1966)	Hammack et al. (2003)
	Labor-Stamm Lnd	Feld-Stamm Ungarn	Feld-Stamm Italien	Feld-Stamm USA	Feld-Stamm USA
	MW \pm SE (n)	MW \pm SE (n)	MW \pm SE (n=2063)	MW, Min-Max (n)	MW \pm SE (n=>150)
1	225 \pm 0,4 (451) ^a	221 \pm 0,5 (373) ^b	225 \pm 3	200, 200–225 (55)	216 \pm 1
2	343 \pm 0,7 (478) ^a	336 \pm 0,6 (538) ^b	350 \pm 2	325, 300–350 (14)	332 \pm 1
3	522 \pm 1,7 (220) ^a	508 \pm 0,9 (437) ^b	524 \pm 1	500, 450–550 (18)	501 \pm 1

^{a,b} unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikanten Unterschiede, Mann-Whitney-Test, $p < 0.05$

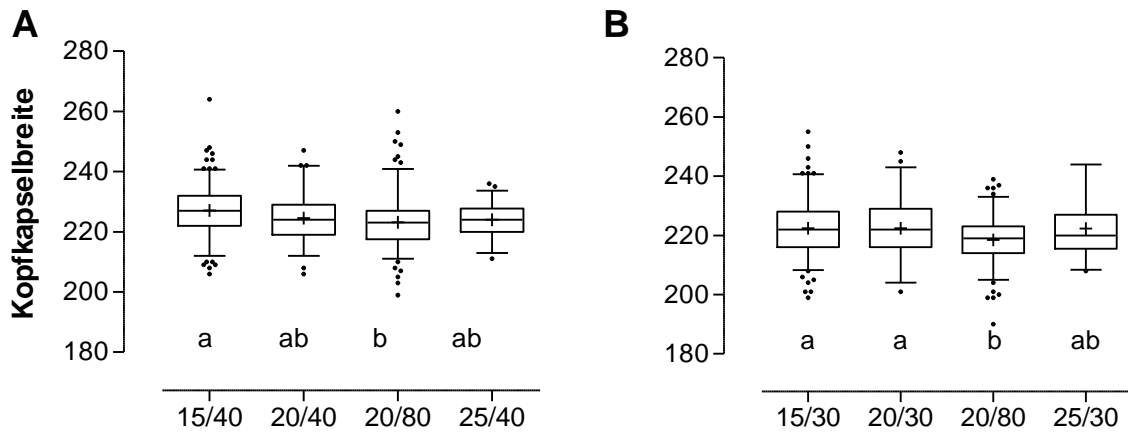


Abb. 20: Kopfkapselbreiten (μm) des ersten Larvenstadiums, **A** – des nicht-diapausierenden Labor-Stamms und **B** – des ungarischen Feld-Stamms bei unterschiedlichen Temperaturen und Besatzdichten (z.B. 15/40 = 15 °C, 40 L1).
(unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikanten Unterschiede, $p < 0.05$)

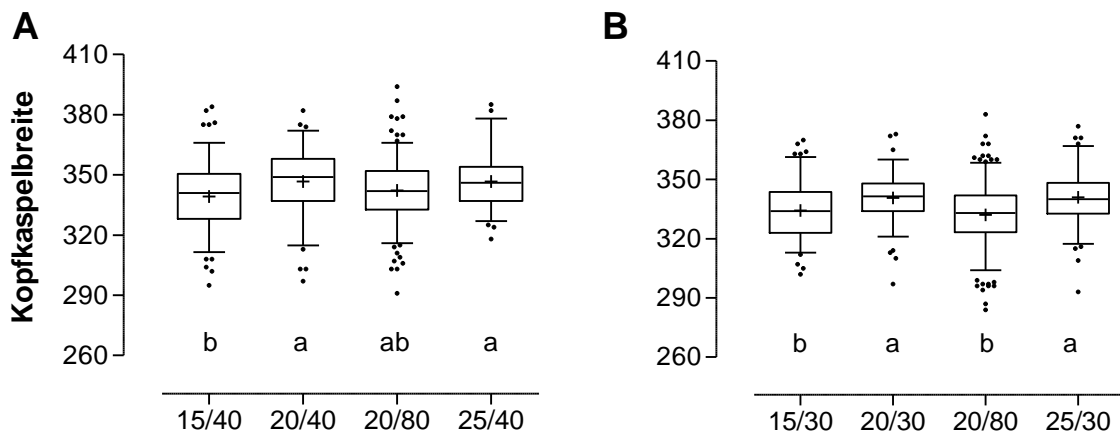


Abb. 21: Kopfkapselbreiten (μm) des zweiten Larvenstadiums, **A** – des nicht-diapausierenden Labor-Stamms und **B** – des ungarischen Feld-Stamms bei unterschiedlichen Temperaturen und Besatzdichten (z.B. 15/40 = 15 °C, 40 L1).
(unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikanten Unterschiede, $p < 0.05$)

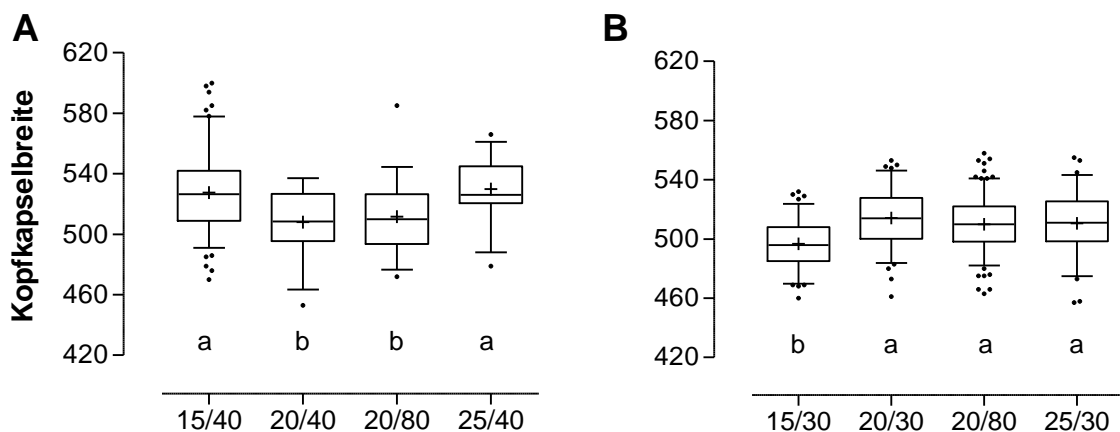


Abb. 22: Kopfkapselbreiten (μm) des dritten Larvenstadiums, **A** – des nicht-diapausierenden Labor-Stamms und **B** – des ungarischen Feld-Stamms bei unterschiedlichen Temperaturen und Besatzdichten (z.B. 15/40 = 15 °C, 40 L1).
(unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikanten Unterschiede, $p < 0.05$)

Wird die Produktion der Eier nur auf solche Paare bezogen, in denen die Weibchen nicht vor Ablauf der Versuchsdauer starben, zeigten ebenfalls die Käfer aus 20°C die höchste Fruchtbarkeit (615 Eier/Weibchen), gefolgt von den Tieren aus 15°C (559 Eier/Weibchen) und den Käfern aus 25°C (484 Eier/Weibchen). Die Weibchen, die sich unter den Bedingungen höherer Besiedlungsdichte bei 20°C entwickelten, lassen eine negative Beeinflussung erkennen (322 Eier/Weibchen).

Da in den Versuchen mit dem ungarischen Feld-Stamm nur wenige Adulte schlüpften (alle bei 20°C herangewachsen), konnte auch nur die Fruchtbarkeit weniger Weibchen bestimmt werden. Die Fruchtbarkeit der Weibchen dieses Stamms ist insgesamt deutlich geringer. Während unter Berücksichtigung aller Paare die Weibchen, die sich in höherer Besiedlungsdichte entwickelten, im Mittel nur 62 Eier ablegten, zeigten die Tiere aus der geringeren Besiedlungsdichte eine noch geringere Fruchtbarkeit (48 Eier/Weibchen). Wird die Produktion der Eier nur auf solche Paare bezogen, in denen die Weibchen nicht vor Ablauf der Versuchsdauer starben, erhöht sich die Zahl produzierter Eier nur wenig (91 Eier/Weibchen aus der höheren Besiedlungsdichte, 96 Eier/Weibchen aus der niedrigeren Besiedlungsdichte).

Tab. 7: Einfluss der Temperatur (°C) und der Besiedlungsdichte auf die Mittelwerte (\pm SD) des Gewichts (mg) und ausgewählter Größenparameter (mm) adulter Käfer des ungarischen Feld-Stamms (**H**) und des nicht-diapausierenden Labor-Stamms (**U**). (M Männchen, F Weibchen, FG Feuchtgewicht, E Elytren, Pn Pronotum, KKB Kopfkapselbreite, hT hintere Tibia)

	Temp	Dichte	Sex	FG	E-Länge	E-Breite	Pn-Breite	KKB	hT-Länge	(n)
H	15	30	M	7.54	3.66	1.83	1.22	0.98	1.53	1
	20	30	M	6.62 \pm 1.30	3.64 \pm 0.25	2.06 \pm 0.19	1.27 \pm 0.09	1.03 \pm 0.12	1.46 \pm 0.16	29
	20	80	F	7.20 \pm 1.89	3.76 \pm 0.32	2.17 \pm 0.21	1.34 \pm 0.11	1.03 \pm 0.09	1.53 \pm 0.15	21
			M	8.54 \pm 2.89	3.87 \pm 0.28	2.20 \pm 0.18	1.33 \pm 0.11	1.08 \pm 0.08	1.56 \pm 0.15	78
	25	30	M	6.00 \pm 1.32	3.76 \pm 0.22	2.03 \pm 0.16	1.26 \pm 0.06	1.11 \pm 0.09	1.32 \pm 0.13	9
U	15	40	F	9.20 \pm 1.54	4.17 \pm 0.09	2.30 \pm 0.04	1.38 \pm 0.07	1.18 \pm 0.04	1.61 \pm 0.09	3
			M	9.17 \pm 1.34	4.05 \pm 0.25	2.27 \pm 0.15	1.39 \pm 0.08	1.22 \pm 0.11	1.66 \pm 0.16	5
	20	40	F	10.66 \pm 1.93	4.31 \pm 0.19	2.60 \pm 0.09	1.48 \pm 0.07	1.24 \pm 0.04	1.75 \pm 0.09	3
			M	9.82 \pm 2.43	3.92 \pm 0.94	2.35 \pm 0.24	1.43 \pm 0.11	1.19 \pm 0.11	1.72 \pm 0.20	16
	20	80	F	9.37 \pm 7.27	4.09 \pm 0.41	2.33 \pm 0.31	1.45 \pm 0.13	1.13 \pm 0.12	1.71 \pm 0.26	9
			M	9.29 \pm 2.26	3.98 \pm 0.40	2.29 \pm 0.30	1.40 \pm 0.16	1.17 \pm 0.10	1.68 \pm 0.18	14
	25	40	F	7.96 \pm 1.34	3.94 \pm 0.20	2.30 \pm 0.12	1.41 \pm 0.07	1.14 \pm 0.04	1.55 \pm 0.10	9
			M	4.81 \pm 3.23	3.78 \pm 0.51	2.22 \pm 0.28	1.36 \pm 0.11	1.12 \pm 0.07	1.63 \pm 0.14	25

TA 6 – Zur Untersuchung der Orientierung bzw. Wirtsfindung der Larven wurden verschiedene Versuche durchgeführt. Die Verteilung der Larven des Tests zur Bestimmung einer optimalen Versuchsdauer ist in Abb. 23 dargestellt. Nach sechs und 24 h wurden die meisten Larven noch in den beiden Abschnitten rechts und links des Besatzpunktes nachgewiesen. In der 48 h-Variante befand sich die Mehrzahl der Larven dagegen im Abschnitt der Maispflanze.

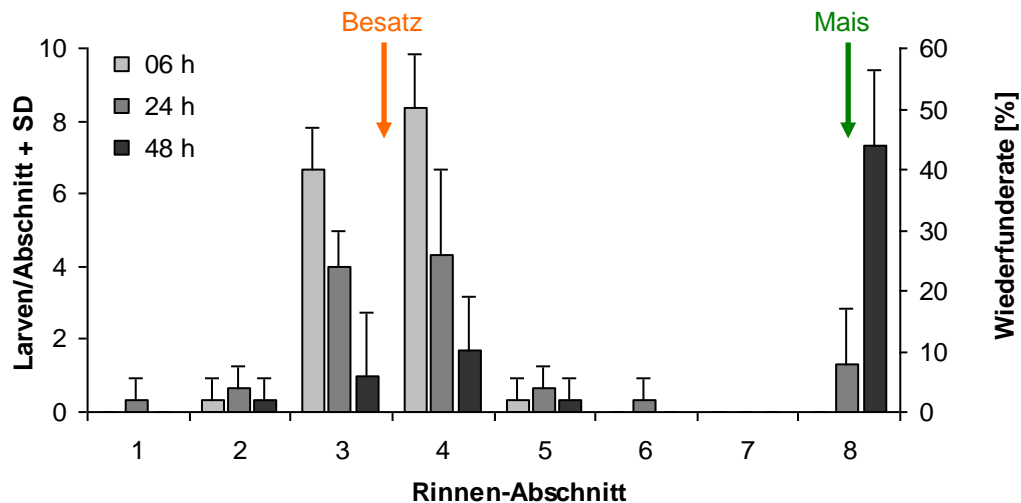


Abb. 23: Verteilung (Mittelwerte \pm SD, je Variante $n=3$) von *Diabrotica v. virgifera* Larven (L3) in Laufrinnen nach 6, 24 und 48 h. ‚Besatz‘ und ‚Mais‘ markieren die Abschnitte des Larven-Besatzpunktes und den Standort der Maispflanze

Die Wiederfunderate des 6 h-Teilversuchs war mit 78,3 % größer als die der beiden anderen Varianten, 58,3 und 53,3 % für 24 und 48 h (Abb. 24).

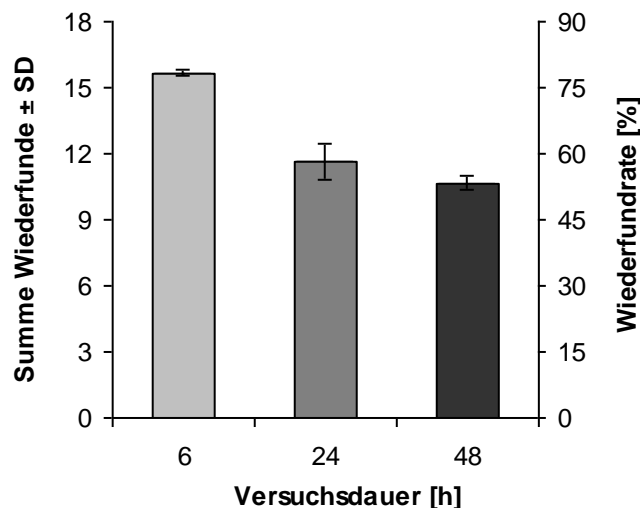


Abb. 24: Prozentuale Wiederfunderate (Mittelwerte \pm SD, je Variante $n=3$) in Abhängigkeit der Versuchsdauer.

In einem weiteren Versuch wurden zwei verschiedene *Sorghum*-Sorten als Lockpflanzen eingesetzt, von denen bekannt war, dass sie als Wirtspflanzen für *Diabrotica*-Larven ungeeignet sind (Teilprojekt: ‚Wirtspflanzeneignung von Energiepflanzen‘, gefördert durch den Freistaat Bayern). Die Reaktion der Larven auf diese Pflanzen ist nicht von der zu unterscheiden, die durch die Wirtspflanze Mais (Abb. 23) induziert wurde (s. Abb. 25). Es ließ sich somit keine für Mais spezifische Anlockung der Larven nachweisen.

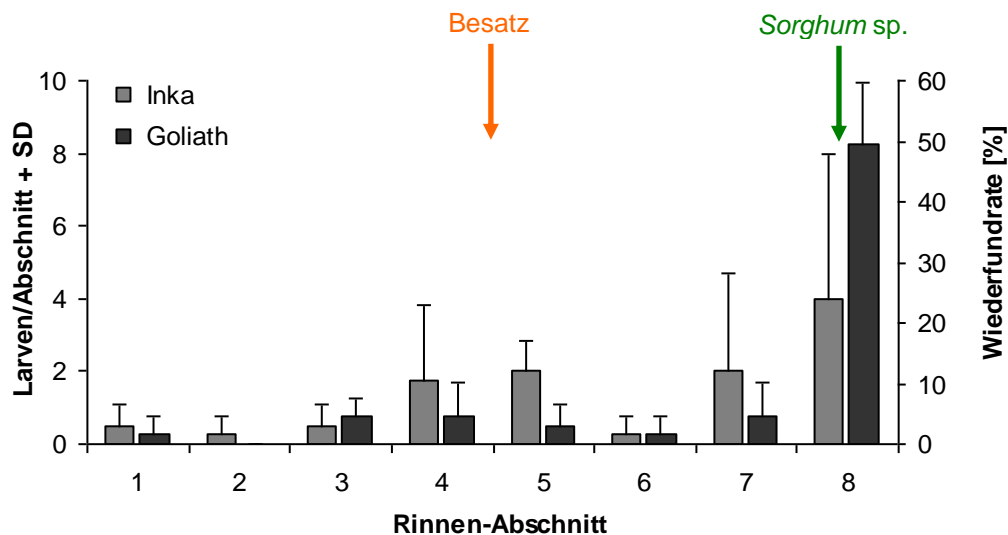


Abb. 25: Verteilung (Mittelwerte \pm SD) von *Diabrotica v. virgifera* Larven (L3) in Laufrinnen 48 h nach Besatz (je Variante n=5). ‚Besatz‘ und ‚Sorghum sp.‘ markieren die Abschnitte des Larven-Besatzpunktes und den Standort der *Sorghum*-Pflanze

Die Eigenschaften eines inneren Bodenersatz-Systems aus Glaskugeln werden maßgeblich durch die Kugeldurchmesser bestimmt. Die kleinsten Perlen (0,8–1,0 mm) ermöglichten aufgrund des geringen Porenvolumens (Saugspannung) die beste Verteilung des Wassers und damit auch das beste Pflanzenwachstum. Allerdings war die Beweglichkeit der Larven stark eingeschränkt. Beobachtungen zeigten, dass die Kugelzwischenräume, auch für L1 zu klein sind und die Bewegung nur durch das Beiseite-Schieben der Perlen mit den Mandibeln möglich war. Die Porenvolumina der beiden größeren getesteten Kugel-Durchmesser sind so bemessen, dass sich die Larven darin frei bewegen können. Allerdings reicht hier die Saugspannung des Systems nicht aus, um frische Maiskeimlinge mit ausreichend Wasser zu versorgen. Zum Anziehen der Pflanzen sind die Rinnen daher fast bis an die Oberkante der Glaskugeln mit Wasser aufzufüllen (Abb. 26). Nach dem Erreichen des gewünschten Wuchsstadiums kann dann mit einer Ablassschraube der Wasserstand so justiert werden, dass die Pflanzen versorgt sind und ausreichend Raum für die Larven zu Verfügung steht. Bei den Kugeln mittleren Durchmessers (1,3–1,7 mm) verbleibt zwischen den Kugeln jedoch noch so viel Wasser, dass frisch geschlüpfte Larven aufgrund der Oberflächenspannung „gefangen“ werden. Da auch das Handling (Befüllen der Rinnen, Reinigung etc.) der großen Kugeln (3,0 mm) am einfachsten war, wurden alle Versuche mit diesen durchgeführt. Die Extraktion von Larven aus den Glasperlen kann sehr effektiv durch das Aufschwemmen in 1,25 M Magnesiumsulfat-Lösung (MgSO_4) erfolgen.

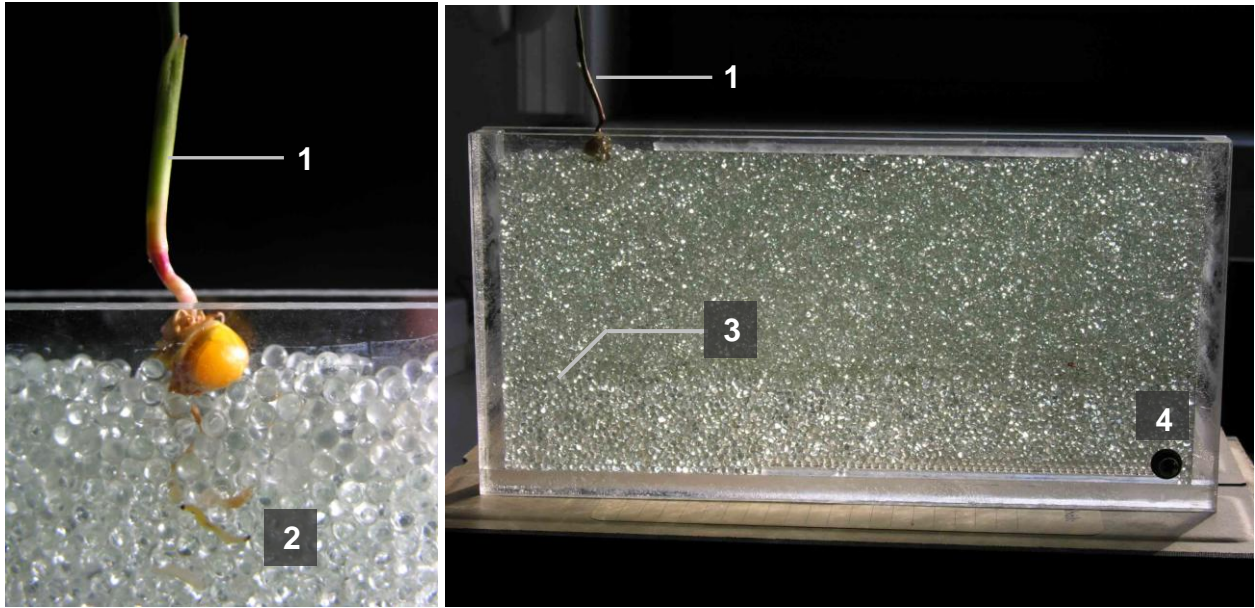


Abb. 26: Acrylglas-Laufrinnen mit 3 mm Glaskugeln (1 – Mais-, Testpflanze; 2 – Larve [L3], 3 – Wasserstand, 4 – Wasserablaufschraube).

Vorbereitende massenspektrometrische Untersuchungen im Rahmen der Systemprüfung, die durch das STZ Soil Biotechnology und die Universität Rostock durchgeführt wurden, zeigten nur geringfügige Abweichungen mit dem zum Vergleich gemessenen Leitungswasser, das zum Gießen genutzt wurde. Bedenken, dass Ausdünstungen des Acryls oder des verwendeten Klebers zu starke Hintergrundsignale verursachen, ließen sich nicht bestätigen. Weitere Messungen erfolgten sowohl im luft-, als auch wassergefüllten Zwischenraum, um sowohl flüchtige, als auch wasserlösliche Duftstoffe erfassen zu können. Da alle bisher publizierten Daten zur Wirtsfindung auf luftlösliche Duftstoffe basieren, könnte die publizierte Schlussfolgerung, dass nur CO₂ als Lockstoff von Bedeutung ist, methodische Gründe haben. Die Machbarkeitsstudie zur Prüfung der Nachweisbarkeit von gasförmigen/leichtflüchtigen Substanzen auf der Basis einer *in-vitro* Messung durch online-Kopplung der Laufrinnen mit einem Massenspektrometer über eine Kapillare mit Felddesorption Massenspektrometrie ergab, dass unter den experimentellen Bedingungen ein CO₂-Gradient im Wurzelraum im Vergleich zur CO₂-Konzentration in der Umgebungsluft nicht erfasst werden kann. Zudem sind die Konzentrationen anderer flüchtiger Substanzen zu gering. Für eine Detektion und Quantifizierung werden deshalb Anreicherungsverfahren (wie z.B. Festphasenmikroextraktion) empfohlen.

Die Testung auf Unterschiede zwischen den Mais-Exsudatproben belegt einen „Fraßeffekt“ für LR A; die Probe ist auf der Basis einer Diskriminanzanalyse (Abb. 29, links) deutlich von den anderen Proben separiert, wie der Score-Plot der ersten beiden Hauptkomponenten (PC1 und PC2) zeigt. Diese erklären in der Summe 84,4% der Gesamtvarianz. Auf der Basis des univariaten Wilks'-Lambda-Test, gekoppelt mit einem multiplen *F*-Test, werden 11 *m/z*-Signale mit höchster Diskriminierungskraft ausgewiesen ($P < 0,001$). Die signifikant trennenden Massen liegen überwiegend im Bereich um *m/z* 300. Eines der signifikantesten Massensignale war *m/z* 316. Dieses hatte in der Probe der LR A die höchste relative Häufigkeit (% TII). Auf der Basis einer Korrektur durch Massenkalibrationsdaten (Referenzsubstanz Perfluorkerosin) konnte die Summelformel für das Massensignal abgeleitet werden. Es ergab sich die die Formel C₁₈H₃₆O₄, wofür praktisch nur Dihydroxystearinsäure in Frage kommt. Durch die Literatur wird belegt, dass es sich dabei um ein bekanntes Phytotoxin handelt, welches Einfluss auf das Wurzelwachstum hat. Neben der Summenformel für *m/z* 316 konnten durch hochauflösende Messungen bzw. Auswertungen in Verbindung mit der thermischen Freisetzung auch noch weitere Substanzen identifiziert/verifiziert werden, wie beispielsweise Galacturon- und Glucuronsäure (C₆H₁₀O₇) als dominierende Zuckerverbindungen in Mais-Rhizodepositionen.

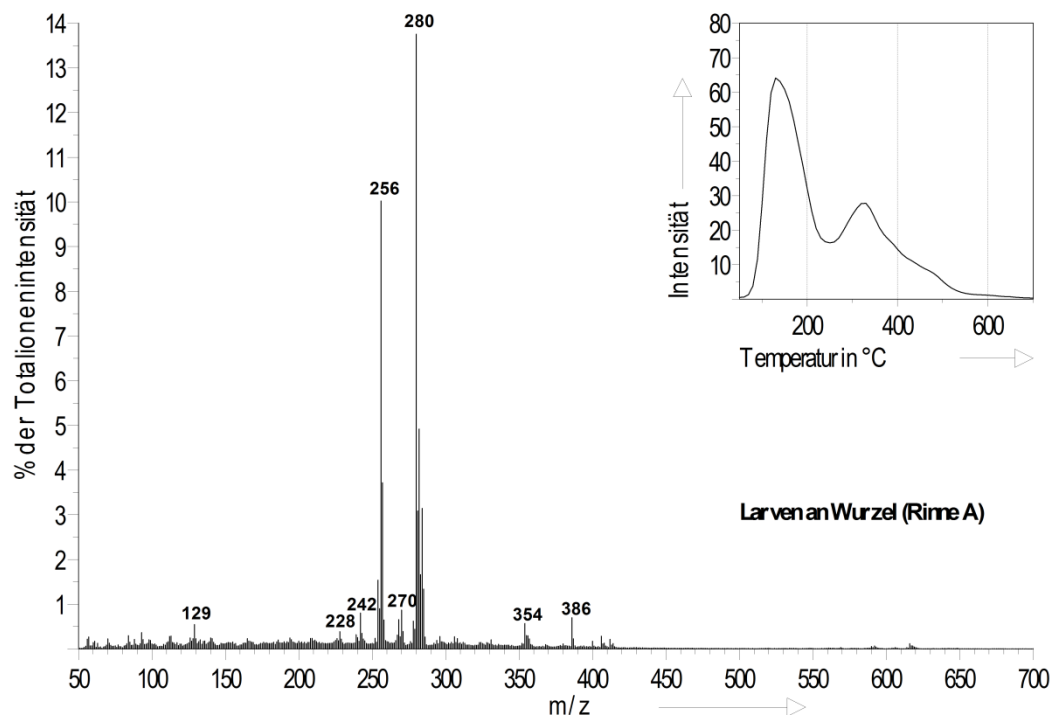


Abb. 27: Thermogramm der Totalionenintensität (oben rechts) und summiertes Py-FI Massenspektrum von *Diabrotica*-Larven.

Zur weiteren Eingrenzung der Quellen der einzelnen, unterschiedsgebenden m/z -Signale wurden neben den Rhizodepositionen auch die Wurzeln zu Versuchsende und an den Wurzeln haftende Larven separiert, lyophilisiert, homogenisiert und durch Py-FIMS untersucht. Im Py-FI Massenspektrum einer aus 2 Larven des Maiswurzelbohrers bestehenden Probe (Abb. 27) dominieren die Fettsäuren m/z 256, 280, 282, 284. Eine Besonderheit im Thermogramm der TII stellt das zweite Maximum bei 300°C dar. In diesem Temperaturbereich erfolgt im Wesentlichen die Freisetzung von m/z 129, wobei es sich nach erster, vorsichtiger Zuordnung um Chinolin handelt, einem bekannten Inhaltsstoff von Larven. Im Vergleich mit den Spektren der Bodenlösung muss festgestellt werden, dass die in den Bodenlösungen unterschiedsgebenden Massensignale, im Py-FI-Spektrum der Larven von untergeordneter Bedeutung (sehr niedrige relative Vorkommen) sind. Demzufolge wären die unterschiedsgebenden m/z -Signale der Exsudate auf Bestandteile der Maiswurzel, wie epikutikuläre Wachse und Suberin zurückzuführen. Es kann angenommen werden, dass sich die Larven durch die Wachs- bzw. Suberin-Schicht fressen und diese Bestandteile entweder gar nicht erst durch die Larve aufgenommen oder unverdaut wieder ausgeschieden werden. Dadurch erhöht sich der Anteil der Wachse und Suberine in der Bodenlösung. In Konsequenz würde das Anlocken anderer Tiere nicht durch eine Reaktion der Pflanze erfolgen, sondern einen eher passiven Vorgang darstellen.

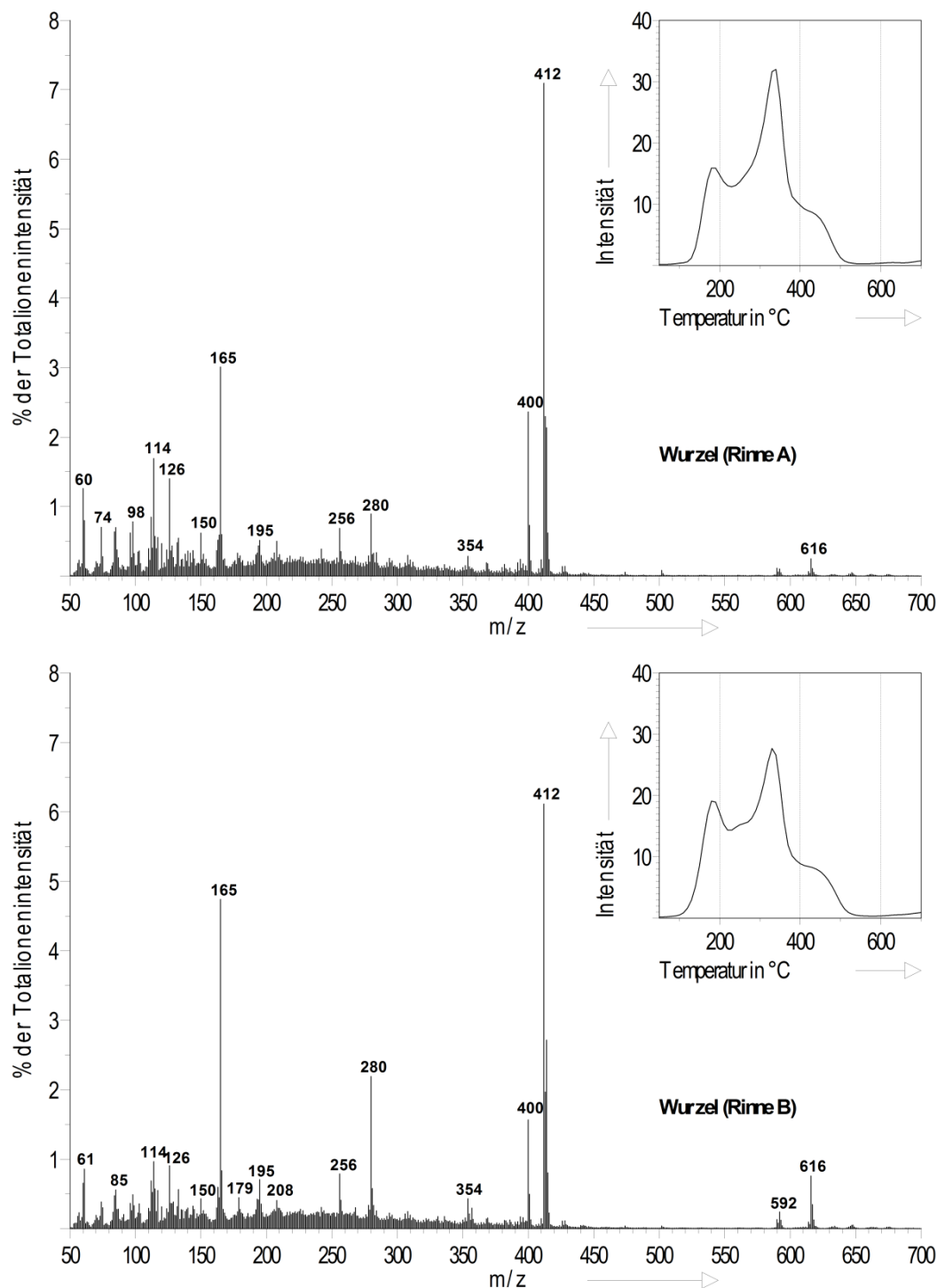


Abb. 28: Thermogramm der Totalionenintensität (oben rechts) und summiertes, gemittelt Py-FI Massenspektrum von Maiswurzeln mit (oben) und ohne *Diabrotica*-Larven-Besatz (unten).

Die Ergebnisse der Untersuchungen an Maiswurzeln, die zu einer weiteren Aufklärung von Fraßeffekten durch *Diabrotica*-Larven beitragen sollten, sind in Form der Thermogramme der TII und der gemittelten und summierten Massenspektren, beispielhaft für die LR A und B in Abb. 28 dargestellt. Im Gegensatz zu den Rhizodepositionen sind Markersignale für isoprenoide Verbindungen (überwiegend Phytosterole) dominierend. Diese werden im Massenspektrum durch Campesterol (m/z 410), Stigmasterol (m/z 412) und β -Sitosterol (m/z 414) repräsentiert. Hinzu kommen charakteristische m/z -Signale von Diglyceriden (m/z 592 und 616). Wie bei den Exsudaten, wurde auch hier eine vergleichende Auswertung des gesamten massenspektrometrischen Patterns durch multivariate Statistik vorgenommen (Abb. 29, rechts).

In Übereinstimmung mit den Aussagen der Diskriminanzanalyse für die Exsudate, konnte auch bei den Wurzeln die LR A als signifikant verschieden von den anderen abgegrenzt werden. Der in Abb. 29 dargestellte Score-Plot der ersten beiden Hauptkomponenten, die in der Summe 80,2% der Gesamtvarianz erklären, verdeutlicht aber auch, dass (1) die Proben aus LR B und C Clustern, während (2) die Probe von LR D ebenfalls deutlich von den anderen Proben separiert ist. Die Zahl der m/z -Signale, die signifikant zu den Unterschieden beitragen, ist zahlenmäßig geringer als bei den Exsudaten. Demnach haben 3 ($P < 0,001$), 12 ($P < 0,01$) und 54 ($P < 0,05$) Massensignale signifikanten Einfluss auf die Differenzierung.

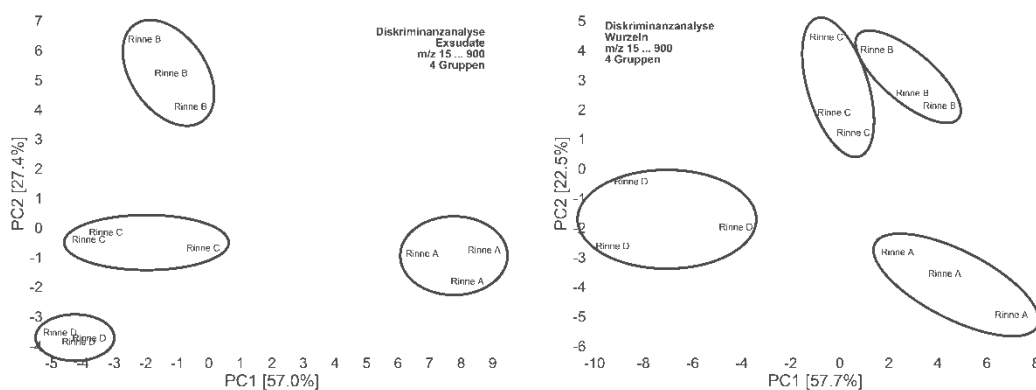


Abb. 29: Score-Plots der Diskriminanzanalyse aus den ersten beiden Hauptkomponenten (PC1 und PC2) der Py-FIMS-Daten für die Maisexsudate (links) und –wurzeln (rechts)

Zur genaueren Charakterisierung der Bodenlösungen aus den LR-Versuchen und Identifizierung einzelner Verbindungen wurden Messungen mit ultrahochoflösender Fourier-Transformation Ionencyclotronresonanz-Massenspektrometrie (FT-ICR-MS) durchgeführt. Im Zuge der notwendigen Optimierung der Geräteparameter wurde zunächst die vermutete Substanz Dihydroxystearinsäure als Standard mit Elektrospray-Ionisation im negativen Modus gemessen (Hauptpeak M-H m/z 315,25420) (Abb. 30). Um eine spätere Strukturaufklärung relevanter Moleküle in den unbekanntenen Proben aus den LR zu ermöglichen, wurde die Verbindung in der Ionisationsquelle fragmentiert, wobei die Fragmente m/z 279,23336 ($2 \times \text{H}_2\text{O}$ -Abspaltung) und m/z 297,24383 (H_2O -Abspaltung) detektiert wurden (Abb. 31). Daraus folgt, dass die Substanz grundsätzlich mit dem FT-ICR sicher identifiziert werden könnte. Die weiteren noch laufenden Untersuchungen betreffen die Messung und Auswertung der aus unterschiedlichen Entfernungen zur wachsenden Maiswurzel (2, 12, 22 cm) entnommenen Proben in allen Varianten mit und ohne Besatz durch *Diabrotica*-Larven. Als ein Beispiel für die dabei offensichtlich werdende außerordentliche Komplexität der Spektren ist in Abb. 32 der Massenbereich m/z 100-900 mit Ausschnittsvergrößerung im Bereich m/z 310-320 gezeigt.

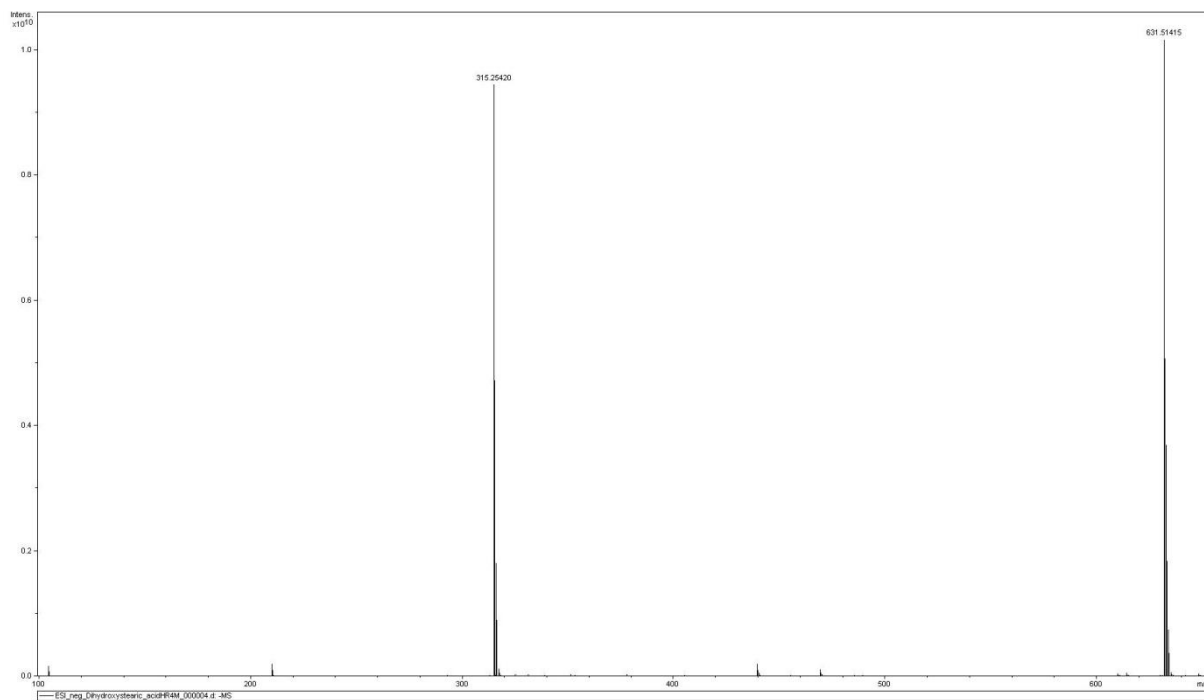


Abb. 30: FT-ICR-Massenspektrum der Dihydroxystearinsäure.

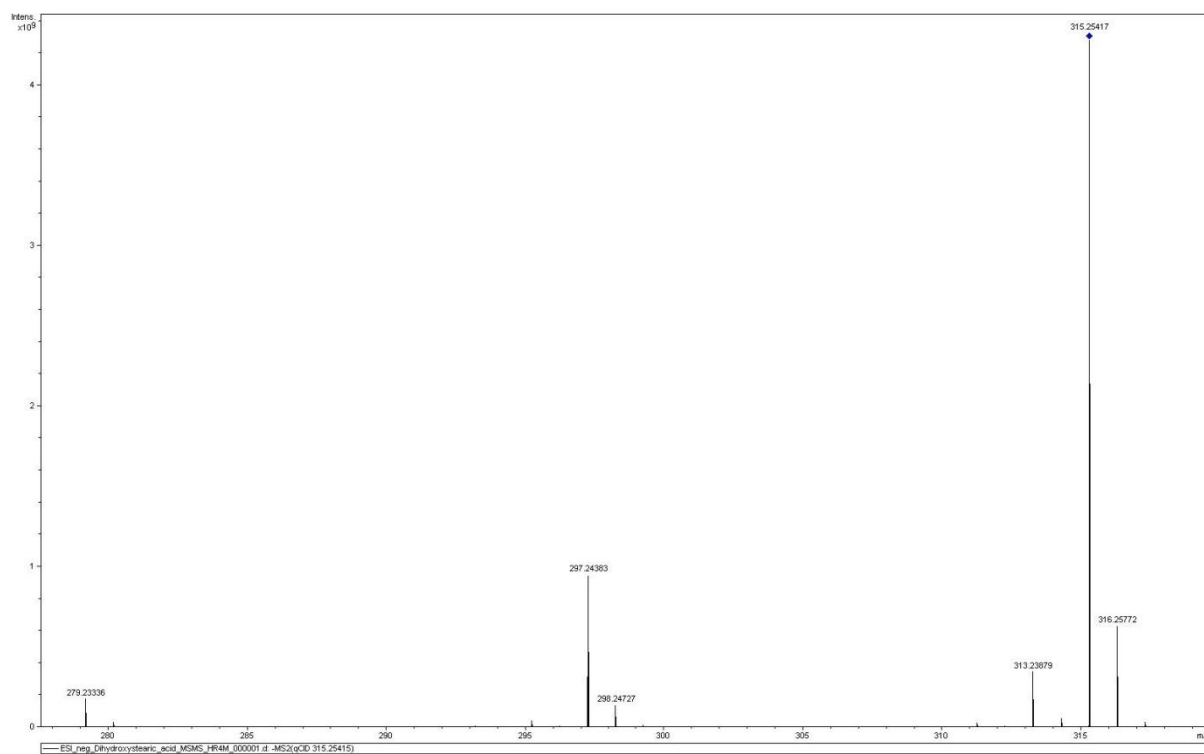


Abb. 31: FT-ICR-Massenspektrum der fragmentierten Dihydroxystearinsäure.

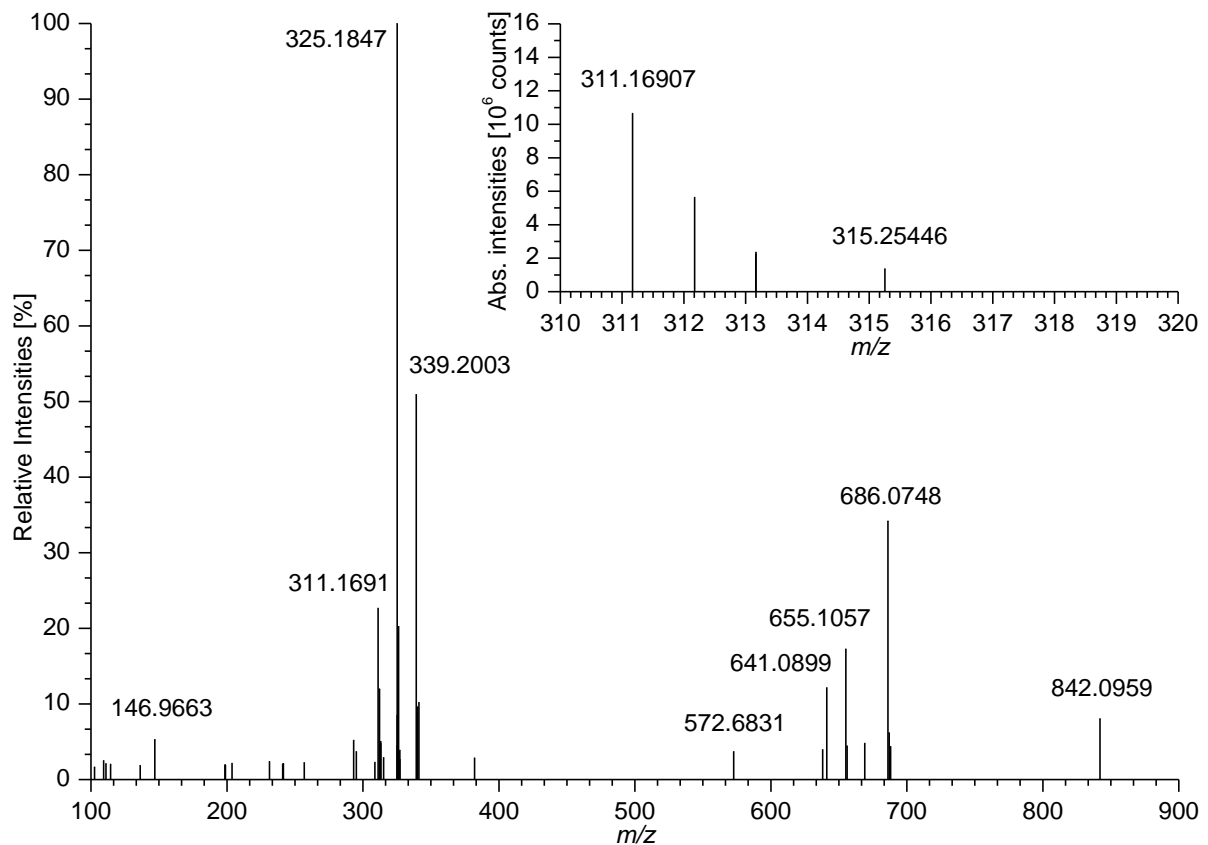


Abb. 32: FT-ICR-Massenspektren von rückgelösten lyophilisierten Wurzelexudaten aus dem Laufrinnenversuch mit *Diabrotica*-Larven.

Für die Interpretation der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass Dihydroxystearinsäure (gesättigte langkettige Fettsäure mit 18 C-Atomen) chemisch verwandt ist mit Linol-, Linolen- und Ölsäure (ebenfalls Fettsäuren mit 18 C-Atomen). Diese können auch als Lockstoffe fungieren, wirken zumindest aber fraßstimulierend und sind dadurch auch für die Wirtserkennung von Bedeutung (HIBBARD et al. 1994, BERNKLAU & BJOSTAD 2008, BERNKLAU et al. 2011). Linolsäure ist darüber hinaus ein Grundbaustein für die pflanzeigene Synthese von Jasmonsäure, die als ubiquitäres Phytohormon in vielen Pflanzen für die Steuerung von Wachstums- und Alterungsprozessen und darüber hinaus in vielfältiger Weise bei der induzierten Abwehr von biotischen (z.B. Pathogenen und Herbivoren) und abiotischen Faktoren verantwortlich ist. In dieser Hinsicht interessant sind die Untersuchungen von BJOSTAD & HIBBARD (1992), die zeigen, dass eine Hydroxamsäure (6-Methoxy-2-benzoxazolinon, MBOA), die ebenfalls bei der (induzierten) Abwehr von Herbivoren eine wichtige Rolle spielt (z.B. bei Mais für den Maiszünsler und andere Insekten toxisch ist), von *Diabrotica*-Larven als Lockstoff von Maiswurzeln wahrgenommen wird.

Neben der Analyse wechselseitiger Interaktionen zur Erkennung möglicher Resistenzen ist die Berücksichtigung tritrophischer Interaktionen zwingend erforderlich.

Besondere Aufmerksamkeit ist zukünftig auch auf die Festlegung der Versuchsdauer zu legen. Für die Bewertung der Orientierungsfähigkeit von *Diabrotica*-Larven im Boden wird regelmäßig auf die Ergebnisse von BRANSON (1982) verwiesen (Abb. 33). Danach differenzieren die Larven in Wahlversuchen nicht zwischen Mais und drei Nicht-Wirtspflanzen (Sojabohne, Kürbis, Sonnenblume). In diesen Versuchen erfolgte die Bonitur nach 4 Stunden. In ersten eigenen Versuchen konnte jedoch gezeigt werden, dass die Reaktion der Larven auf Pflanzen erst nach längerer Versuchsdauer (ab 6 Stunden) erkennbar ist (Abb. 34, 35).

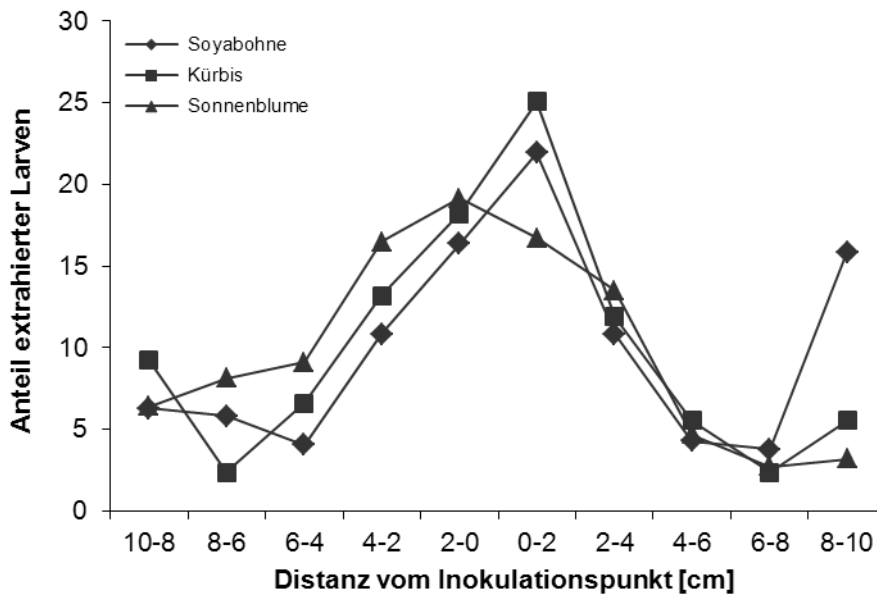


Abb. 33: Mittlerer prozentualer Anteil extrahierter Larven nach vier Stunden. Exposition der Tiere in Wahlsituation mit Mais (auf der rechten Seite) vs. Soyabohne, Kürbis oder Sonnenblume. (Daten aus BRANSON, 1982)

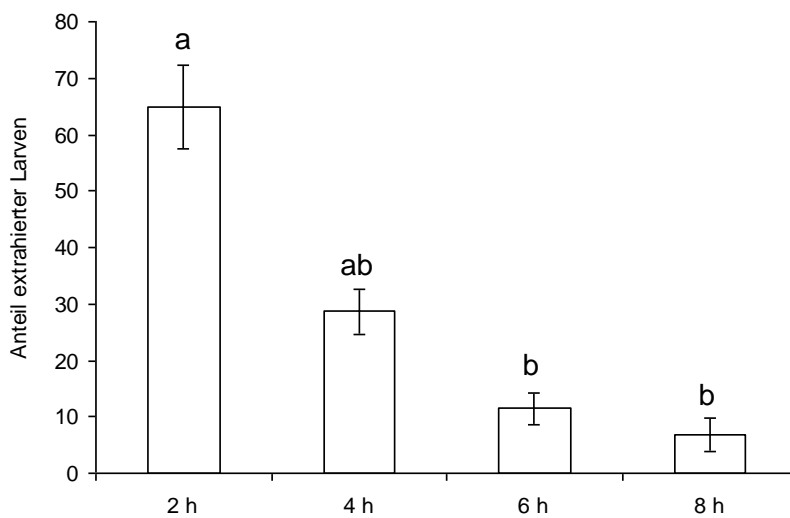


Abb. 34: Mittlerer prozentualer Anteil (\pm SE) extrahierter Larven, die sich in einseitig mit Mais bepflanzten Rinnen nicht aus dem Inokulations-Abschnitt (= Abschnitt 4) heraus bewegten. (n=4, unterschiedliche Buchstaben – signifikante Unterschiede, Kruskal-Wallis, Dunn's-Test, $p < 0,05$)

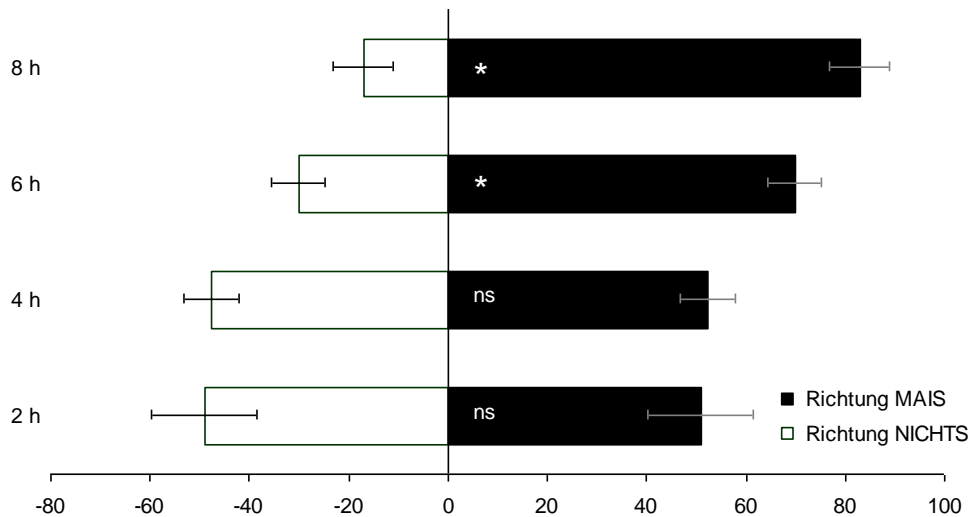


Abb. 35: Mittlerer prozentualer Anteil (\pm SE) extrahierter Larven, die sich aus dem Inokulationsabschnitt in Richtung Maispflanze bzw. in Richtung des unbepflanzten Rinnenteils bewegten. (ns – nicht signifikant, * signifikanter Unterschied, Mann-Whitney Test, $p < 0,05$)

Zur eingehenderen Untersuchung der Wirtsfindung wurden folgende Pflanzen in einem inerten System aus Glaskugeln/Hoagland's Nährlösung (No. 2) in CombiSart™-Gefäßen aus Polycarbonat in fünffacher Wiederholung angezogen und die Rhizodepositionen zu definierten Aufwuchsstadien gewonnen: (1) Mais (als optimale Wirtspflanze), (2) Kartoffel (*Solanum tuberosum*, cv. Delikat), (3) Knaulgras (*Dactylus glomerata*) und (4) Weiche Trespe (*Bromus mollis*). Zudem wurden Blindwerte in Form der Nährlösung (5) ohne Larven und (6) mit Larven erfasst. Als weiteres Prüfglied wurden (7) Maispflanzen angezogen, die mit Larven besetzt wurden.

Die Lösungen wurden, wie bereits für die anderen Untersuchungen mit Py-FIMS, lyophilisiert. Die Thermogramme der TII sowie die gemittelten und summierten Massenspektren der Proben sind in Abb. 36 dargestellt. Es ist auffällig, dass bereits die Blindlösung (Nährlösung ohne Larven) ein breites Spektrum von m/z -Signalen aufweist, womit das Vorkommen organischer Substanzen belegt wird. Diese sind deutlicher Indikator dafür, dass trotz sorgsamer Versuchsvorbereitung und Durchführung, Kontaminationen durch verwendete Kunststoffe und unerwünschtes Algenwachstum aufgetreten sind. Letzteres wird insbesondere durch m/z -Signale dokumentiert, die Chlorophyll repräsentieren. Dennoch lassen sich alle Proben visuell durch den Vergleich der Massenspektren differenzieren. Deutliche Unterschiede zwischen den dargestellten Proben lassen sich zudem auf der Basis der Thermogramme der Totalionenintensität erkennen. Als analytisch besonders schwierig waren die Rhizodepositionsproben von Knaulgras (Abb. 36f) und Weicher Trespe (nicht gezeigt) einzustufen. Hier traten verstärkt Störungen durch anorganische Bestandteile auf. Aus diesem Grund wurden die Daten der Exsudatanalysen für die Weiche Trespe nicht in die vertiefte Auswertung (multivariate Statistik) einbezogen.

Aufgrund der oben beschriebenen Randbedingungen wurden die Untersuchungsergebnisse einer Prüfung auf Ausreißer unterzogen. Demzufolge wurden einige Proben aufgrund verstärkter „Chlorophyllbelastung“ ($n=3$) oder Kontamination (z.B. Styropor, $n=1$) eliminiert. Für die statistische Evaluierung wurden der Temperaturbereich auf 50 bis 450°C und der M/z -Bereich auf 60 bis 450 eingegrenzt.

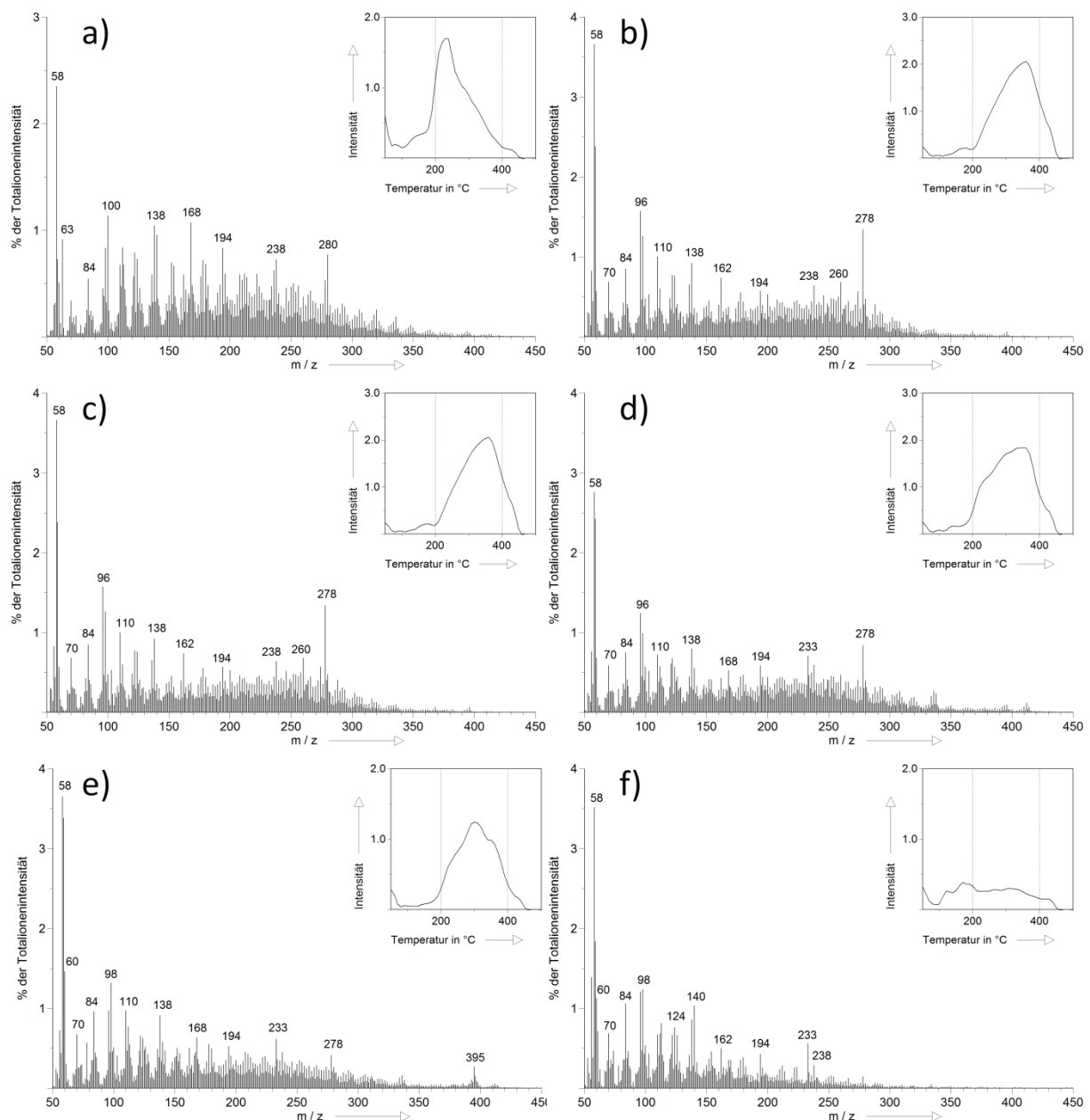


Abb. 36: Thermogramm der Totalionenintensität (oben rechts) und summiertes, gemittelt Py-FI Massenspektrum von gefriergetrockneten Exsudaten von: a) Blindwert ohne Larven, b) Blindwert mit *Diabrotica*-Larven, c) Mais ohne *Diabrotica*-Larven, d) Mais mit *Diabrotica*-Larven, e) Kartoffel und f) Knaulgras.

Das Ergebnis der Diskriminanzanalyse der Massenspektren ist in Abb. 37 dargestellt. Der Score-Plot der ersten beiden Hauptkomponenten (PC1 und PC2), die zusammen 68.3% der Gesamtvarianz im Probenkollektiv erklären, zeigt z.T. deutliche Unterschiede der molekular-chemischen Zusammensetzung der Proben der einzelnen Varianten. Die Einzelbestimmungen lassen sich zunächst in 4 Cluster differenzieren. Dabei unterscheiden sich die Blindwerte deutlich von den Rhizodepositionsproben. Zudem bilden die Proben der einzelnen Kulturpflanzen weitestgehend eigene Cluster. Der Besatz mit *Diabrotica*-Larven scheint zunächst keinen signifikanten Einfluss auf die molekular-chemische Zusammensetzung zu haben, da sowohl bei den Blindwerten, als auch beim Mais, die Kollektive visuell (graphisch) nicht differenziert werden können. Für die Blindwerte ist diese Aussage, da prinzipiell eine nur minimale Veränderung der stofflichen Zusammensetzung durch z.B. Sekretion der Larven erwartet wurde. Für den Mais ist auffällig, dass nur eine Einzelbestimmung die Trennung in zwei

Cluster nicht zulässt. Diese Probe weist noch Chlorophyll-Markersignale auf. Deshalb ist davon auszugehen, dass durch Algenbildung der Effekt von Larvenfraß „maskiert“ wird.

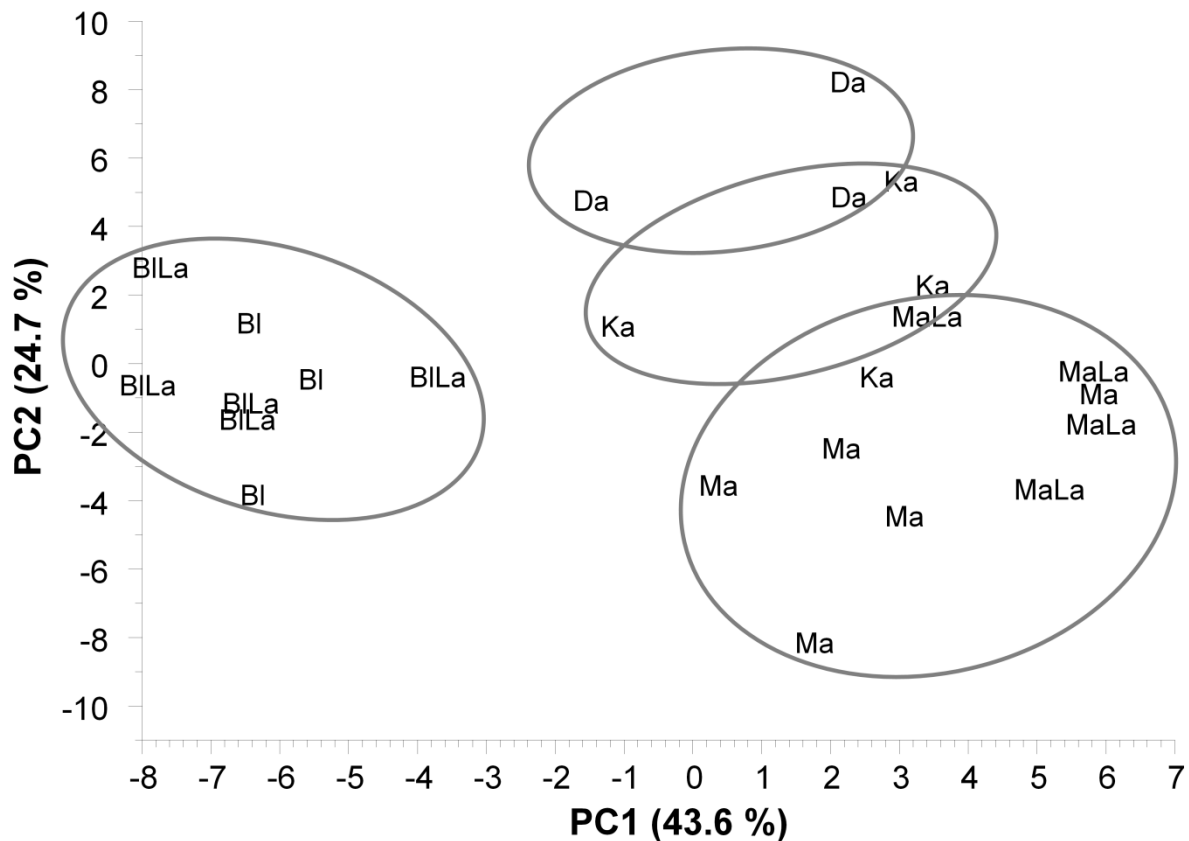


Abb. 37: Multivariate Statistik (Diskriminanzanalyse) zu den Py-FI Massenspektren aus dem Versuchsaufbau „Wirtsfindung/Rhizodeposition“: Score-Plot der Hauptkomponenten 1 und 2 zur Differenzierung der Lyophilisatproben für Blindwerte mit und ohne Larven (BILa und BI), Mais mit und ohne Larven (MaLa und Ma), Kartoffel (Ka) und Knaulgras (Da).

TA 7 – Für die Modellierung der Populationsdynamik von *D. v. virgifera* ist die Fähigkeit der Larven, Futtermangel zu überstehen, eine wichtige Größe. Deshalb wurden Laborversuche durchgeführt, in denen Tiere des ersten Larvenstadiums nach Bestimmung ihres Ausgangsgewichts unterschiedlichen Hungerperioden ausgesetzt und danach die Anzahl der Überlebenden und deren biologische Leistung (Gewicht) bestimmt wurden. Die Ergebnisse des Hungerversuchs sind in der Tab. 8 dargestellt. Die Anzahl der Überlebenden und ihr Gewicht nehmen trotz 2tägiger Fütterung mit zunehmender Dauer des Hungers ab. Die Überlebensrate der Larven nimmt mit zunehmender Hungerperiode (und anschließender Fütterung für 2 Tage) zu. Eine Hungerperiode von 1,816 Tagen (bzw. ein Gewicht von 0,2012 mg) induziert eine Überlebensrate von 0,02 (=50% Mortalität).

Tab. 8: Mittelwert (\pm SD) des Gewichts und Überlebende des ersten Larvenstadiums von *Diabrotica* des nicht-diapausierenden Labor-Stamms nach einer Hungerperiode. (HT Dauer der Hungerperiode, nH nach Ablauf der Hungerperiode, n2df nach Fütterung über 2 Tage)

HT (d)	Gewicht (mg)			Anzahl (n)			Überlebende (%)	
	Start	nH	n2dF	Start	nH	n2dF	nH	n2dF
0	0,060 \pm 0,005		0,264 \pm 0,073	20		17		85
1	0,058 \pm 0,004	0,060 \pm 0,003	0,210 \pm 0,053	20	20	16	100	80
2	0,060 \pm 0,007	0,054 \pm 0,004	0,198 \pm 0,050	20	8	7	40	35
3	0,057 \pm 0,006	0,046 \pm 0,006	0,162 \pm 0,038	20	18	11	90	55
4	0,057 \pm 0,008	0,044 \pm 0,009	0,146 \pm 0,049	20	12	6	60	30

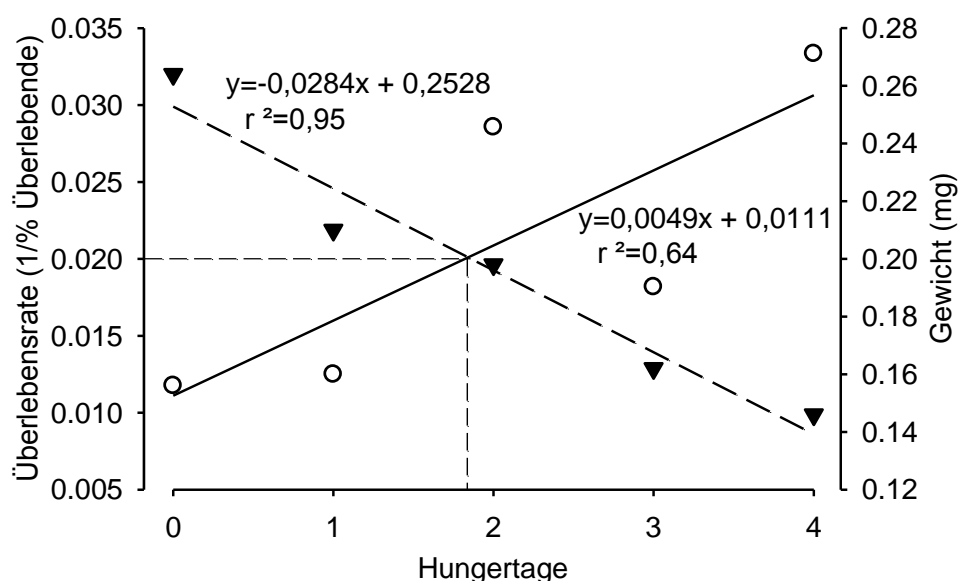


Abb. 38: Überlebensrate (Kreise, durchgezogene Regressionsgerade) und Gewicht (Dreiecke, gestrichelte Regressionsgerade) des ersten Larvenstadiums von *Diabrotica* des nicht-diapausierenden Labor-Stamms nach einer Hungerperiode und anschließender Fütterung für 2 Tage. (Eine Hungerperiode von 1,816 Tagen (bzw. ein Gewicht von 0,2012 mg) entspricht einer Überlebensrate von 0,02 (=50% Mortalität))

Diskussion der Ergebnisse

Die Interpretation der gewonnenen Ergebnisse zur Embryonalentwicklung von ungekühlt gelagerten *Diabrotica*-Eiern wurde durch die methodischen Unterschiede bei der Gewinnung der Eier erschwert. Insbesondere die Unterschiede im Anstieg und der bis zum Versuchsende erreichten Schlupfrate können aufgrund dieser Unterschiede nicht zwingend auf biologische Unterschiede zwischen den Herkünften zurückgeführt werden. Auffällig ist, dass für die ungarische Herkunft bereits nach etwa 110 Tagen der größte Teil der Larven geschlüpft war (Normalverteilung, s. Abb. 1). Die Schlupfrate der italienischen Eier dagegen besitzt einen geringeren Anstieg. Es ist nicht auszuschließen, dass bei einer Fortführung des Versuchs weitere Larven geschlüpft wären.

Die Varianzen beider Versuchsglieder zeigen nur geringfügige Unterschiede, weshalb die Anzahl von zehn Petrischalen (IT) als ausreichend bewertet wird. Aus Amerika sind ähnliche Ergebnisse bekannt. CHIANG et al. (1972) publizierten für einen Feld-Stamm den Schlupfbeginn 6–8 Wochen nach der Eiablage. Sie ermittelten einen Schlupfanteil von 85 % nach insgesamt 20–24 Wochen. GEORGE & ORTMAN (1965) berichten einen geringeren Schlupfanteil von 60 % innerhalb von 189 Tagen. Sie beobachteten den Schlupfbeginn nach 44 Tagen.

Die gewonnenen Daten bestätigen das gewählte Versuchsdesign und sind eine gute Grundlage für die weiteren Arbeiten mit den verschiedenen Herkunftstypen und Temperaturen. Zu beachten ist, dass die unterschiedlichen Temperaturen auch das Wachstum der Maispflanzen beeinflussen. Insbesondere die 15 °C-Variante liegt dicht am unteren Rand des vom Mais tolerierten Temperaturbereichs. Die Besatzdichten wurden so gewählt, dass die Wurzelbiomasse in allen Varianten nicht als limitierender Faktor auftritt. Darüber hinaus wurde nach Rücksprache mit Züchtern der KWS eine besonders robuste und kältetolerante Maissorte (cv. Ronaldinio) für die Versuche verwendet.

Bei der Wahl der Methoden zur Versuchsdurchführung ist das spezifische Verhalten der *Diabrotica*-Larven zu berücksichtigen. Die Larven beißen in Wurzeln Öffnungen, durch die sie das Innere der Wurzeln eindringen können und sich minierend in der Pflanze bewegen. Minierende Larven sind durch die zur Verfügung stehenden Extraktionsverfahren nicht lebendig aus der Wurzel zu treiben.

Die Ergebnisse der Wirtsfindungs-/Orientierungsversuche zeigen, dass der gewählte Versuchsansatz (Form und Größe der Laufrinnen, Befüllung, Larven-Anzucht etc.) für die Beantwortung der Fragestellung geeignet ist. Im ersten Versuch wurde deutlich, dass mit einer Versuchsdauer von 48 h die besten Resultate erzielt werden. Für jüngere Larvenstadien (L₁) ist das Versuchsdesign ebenfalls geprüft worden, da jüngere Larvenstadien andere Fortbewegungsgeschwindigkeiten aufweisen. Es wurde deutlich, dass bei Nutzung von L₁ die Versuchsdauer zu reduzieren ist. Die Resultate des zweiten Versuchs zeigen, dass auch Pflanzen die nicht zum Wirtsspektrum gehören, eine anlockende Wirkung auf die Larven haben.

Durch Nutzung von L₁ war es möglich, nicht nur die Versuchsdauer zu reduzieren, sondern auch die Versuchsbedingungen stärker den natürlichen Bedingungen anzunähern. Die von der AG Leinweber (Uni Rostock) gewonnenen Ergebnisse der bodenkundlichen Analysen lassen die Bedeutung der Dihydroxystearinsäure für die Orientierung der *Diabrotica*-Larven vermuten. Dabei ist zu berücksichtigen, dass von den Pflanzen produzierte/freigesetzte Inhaltsstoffe sehr wohl unterschiedliche Funktionen für die verschiedenen Herbivoren haben können. Deshalb ist neben der Analyse zweiseitiger Interaktionen zur Erkennung möglicher Resistenzen oder der die Orientierung im Boden ermöglichenden olfaktorischen Reize die Berücksichtigung tritrophischer Interaktionen zwingend erforderlich.

Ein wichtiges Ergebnis der durchgeführten Untersuchungen ist auch der im Rahmen der Überprüfung vorliegender Literaturdaten erbrachte Nachweis, dass die Reaktion der Larven auf Pflanzen erst nach längerer Versuchsdauer (ab 6 Stunden) erkennbar ist. Weitere Versuche wären erforderlich, um z.B. den Einfluss einer Bodenverdichtung bzw. Verschlammung auf die Mobilität der Tiere zu analysieren.

Aus den statistischen Auswertung der Rhizodepositions-Daten können die nachstehenden Schlussfolgerungen gezogen werden, die z.T. zwar noch hypothetischen Charakter besitzen, aber dennoch zielführend in Bezug auf bisherige Arbeitshypothesen bzw. richtungsweisend für weitere Versuche sind:

- (1) Unabhängig von den aufgetretenen Problemen, die bei der Analyse durch Py-FIMS offenkundig wurden, ist das gewählte System für die Untersuchung einer Veränderung der stofflichen Zusammensetzung der Rhizodeposition durch Bodenorganismen geeignet.
- (2) Die verschiedenen Kulturarten, die im Rahmen der Studie untersucht wurden, lassen sich hinsichtlich der molekular-chemischen Zusammensetzung ihrer Rhizodeposition differenzieren.
- (3) Das Fraßverhalten der *Diabrotica*-Larven hat einen signifikanten Einfluss auf die molekular-chemische Zusammensetzung der Rhizodeposition bei Mais.
- (4) Eine klare Ausweisung von Massensignalen und somit Substanzen, die für die Wirtsfindung relevant sein könnten, sind auf der Basis des aktuellen Versuchsdesigns nicht möglich.
- (5) Da bei den unterschiedsgebenden *m/z*-Signalen ein signifikant höherer Anteil an Glutaminsäure und Lysin in den Proben von Mais mit *Diabrotica*-Larven gegenüber allen

anderen Proben nachgewiesen wurde, ist das Testsystem in der Lage, tritrophische Interaktionen abzubilden.

Die Versuche zur Hungerfähigkeit der Larven zeigen, dass die Überlebensrate der Larven mit zunehmender Hungerperiode (und anschließender Fütterung für 2 Tage) zunimmt. Eine Hungerperiode von 1,816 Tagen (bzw. ein Trockengewicht von 0,2012 mg) induziert eine Mortalität von 50%. Nicht untersucht werden konnten mögliche Effekte der Temperatur und des Energieverlustes der Larven durch Fortbewegung im Boden. Ein durch Bewegung verursachter Energieverlust wird aber die Hungerfähigkeit nicht erhöhen.

4. Schlussfolgerungen

Durch die große ökologische Plastizität und Anpassungsfähigkeit des Westlichen Maiswurzelbohrers (WMB), *Diabrotica v. virgifera*, können einseitig genutzte Bekämpfungsoptionen gegen den Käfer in nur wenigen Jahren ihre Wirksamkeit verlieren. Daher kann keine der zur Verfügung stehenden Bekämpfungsoptionen die alleinige Lösung des WMB-Problems sein. Vielmehr sind alle Möglichkeiten zu prüfen und in einem integrierten Ansatz zu nutzen. Hierfür sind aber umfangreiche Informationen über die Biologie des Schaderregers erforderlich.

Da die Versuche für andere Projektnehmer des Verbunds von Bedeutung sind, wurden Überlegungen zum Design mit den jeweiligen Kollegen abgestimmt und alle Ergebnisse regelmäßig kommuniziert.

Die für das Vorhaben vorgesehenen Versuche wurden planmäßig begonnen bzw. durchgeführt. Die für alle Versuche essentielle Verfügbarkeit qualitativ hochwertiger Eier (Schlupfrate) konnte durch eigene Sammel- und Zuchtaktivitäten und Kooperationen mit Kollegen für alle zu untersuchenden Herkünfte sichergestellt werden (Meilenstein: M1). Zuchten verschiedener *Diabrotica*-Herkünfte wurden aufgebaut und erfolgten mit mehreren Generationen. Die diapausierenden Feldstämme wurden mit einer Generation pro Jahr erhalten. Schwierigkeiten bei der Larven-Anzucht durch Pilzbefall der Futterpflanzen und eine Infektionen des genutzten Substrats mit Milben (Acari) und Trauermücken (Sciaridae), führten zu einem stark reduzierten und asynchronen Schlupf der adulten Käfer, mit erhöhter Größenvariation und geringer Lebensdauer/Fruchtbarkeit. Dies führte zu einer drastischen Reduktion abgelegter Eier und einer erhöhten Mortalität des Ei-Stadiums der Folgegenerationen. Hierdurch kam es zu Verzögerungen in den Versuchen zur Larvalentwicklung, die aber aufgeholt werden konnten.

Die Versuche zur Embryonalentwicklung ungekühlter *Diabrotica*-Eier lieferten das Ergebnis, dass für die getesteten europäischen Herkünfte kein Nachweis einer nicht-diapausierenden Entwicklung erbracht werden konnte.

Die Untersuchungen über den Zeitverlauf der post-diapausalen Entwicklung der Eier ergab, dass der Schlupf im ungarischen und italienischen Stamm nach 66 Tagen begann, 50% der Eier schlüpft im ungarischen Stamm nach 90 Tagen und im italienischen nach mehr als 133 Tagen.

In Laborversuchen über die Entwicklung der Larven des Schaderregers wurden zur Bestimmung biometrischer Daten einzelne Stadien in unterschiedlichen Dichten verschiedenen Temperaturen ausgesetzt. Vergleiche der eigenen Werte mit den publizierten Werten zeigten, dass die morphometrischen Daten der Larven des italienischen Stamms denen des nicht-diapausierenden Stamms entsprechen. Die Larven dieser Stämme sind deutlich größer als die ungarischen Tiere. Die Trockengewichte der Larven nehmen mit zunehmender Temperatur zu. Das 2. Larvenstadium des nicht-diapausierenden Stamms erreicht bei 15°C (20°C) 75,3% (83,2%) des Trockengewichts von 25°C. Die Variation der Larvendichten induziert keinen Effekt auf die morphometrischen Daten (z.B. Kopfkapselbreite) der Larven des nicht-diapausierenden Stamms. Im Gegensatz dazu sind die Kopfkapselbreiten des 1. und 2. Larvenstadiums des ungarischen Stamms bei höherer Besiedlungsdichte kleiner. Zwischen dem Gewicht der Larven und der adulten Käfer ließen sich direkte Zusammenhänge nachweisen. Da sich im nicht-diapausierende Stamm die größeren Larven entwickelten, bildeten diese dann die größeren adulten Käfer, die auch eine höhere Fruchtbarkeit besaßen.

Mit den Tests zur Wirtfindung wurde der generelle Versuchs-Ablauf optimiert und interessante Ergebnisse gewonnen. Die Versuche zeigten, dass das gewählte Design für die Beantwortung der Fragestellung geeignet ist. Experimente zur Wirtfindung und Orientierung der Larven im Boden wurden in Abstimmung mit der AG Leinweber (Bodenkunde, Universität Rostock) in kombinierten Versuchsansätzen durchgeführt: einerseits in artifiziellen Systemen mit Glas-kugeln, die Messungen mit dem Massenspektrometer ermöglichten und andererseits in mit Erde gefüllten Laufrinnen, die möglichst naturnahe Bedingungen für ein ungestörtes Verhalten der Larven bieten. Nachdem die Versuche aus technischen Gründen zunächst mit dem zweiten und dritten Larvenstadium durchgeführt wurden, gelang es die Methodik 2011 so weit zu optimieren, dass in der letzten Versuchsserie frisch geschlüpfte Larven (L1) genutzt werden konnten.

Die von der AG Leinweber durchgeführten bodenkundlichen Analysen lassen die Bedeutung der Dihydroxystearinsäure für die Orientierung der *Diabrotica*-Larven vermuten. Dabei ist zu berücksichtigen, dass Pflanzeninhaltsstoffe unterschiedliche Funktionen für die verschiedenen Herbivoren haben können. Deshalb ist neben der Analyse zweiseitiger Interaktionen (Pflanze vs. herbivores Taxon an der Wurzel) zur Erkennung möglicher Resistenzen oder der die Orientierung im Boden ermöglichenden olfaktorischen Reize die Berücksichtigung tritrophischer Interaktionen (Pflanze vs. herbivores Taxon an der Wurzel vs. herbivores Taxon/Pathogen an oberirdischen Pflanzenteilen) zwingend erforderlich.

Ein wichtiges Ergebnis der durchgeführten Untersuchungen ist auch der im Rahmen der Überprüfung vorliegender Literaturdaten erbrachte Nachweis, dass die Reaktion der Larven auf Pflanzen erst nach längerer Versuchsdauer (ab 6 Stunden) erkennbar ist. Weitere Versuche wären erforderlich, um z.B. den Einfluss einer Bodenverdichtung bzw. Verschlämmung auf die Mobilität der Tiere zu analysieren.

Die Versuche zur Hungerfähigkeit der Larven ergaben, dass die Anzahl überlebender Larven mit zunehmender Hungerperiode (trotz anschließender Fütterung für 2 Tage) abnimmt. Eine Hungerperiode von 1,816 Tagen (bzw. ein Trockengewicht von 0,2012 mg) induziert eine Mortalität von 50%.

5. Literatur

- BERNKLAU EJ & BJOSTAD LB (1998) Reinvestigation of host location by western corn rootworm larvae (Coleoptera: Chrysomelidae): CO₂ is the only volatile attractant. *Journal of Economic Entomology* **91**: 1331–1340.
- BERNKLAU EJ & BJOSTAD LB (2008) Identification of feeding stimulants in corn roots for western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae. *Journal of Economic Entomology* **101**: 341–351.
- BERNKLAU EJ, BJOSTAD LB & HIBBARD BE (2011) Synthetic feeding stimulants enhance insecticide activity against western corn rootworm larvae, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Applied Entomology* **135**: 47–54.
- BJOSTAD LB & HIBBARD BE (1992) 6-Methoxy-2-benzoxazolinone - a semiochemical for host location by western corn rootworm larvae. *Journal of Chemical Ecology* **18**: 931–944.
- BRANSON TF (1982) Olfactory response of larvae of *Diabrotica virgifera virgifera* to plant roots. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **31**: 303–307.
- CHIANG HC, MIHM JA & WINDELS MB (1972) Temperature effects of hatching of eggs of western and northern corn rootworm. In: *Proceedings of the North Central Branch of the Entomological Society of America* **27**: 127–131.
- FISHER RA (1920) Some remarks on the methods formulated in a recent article on the 'quantitative analysis of plant growth'. *Annals of Applied Biology* **7**: 367–372.
- GEORGE BW & ORTMAN EE (1965) Rearing the western corn rootworm in the laboratory. In: *Journal of Economic Entomology* **58** (2): 375–377.
- HIBBARD BE & BJOSTAD LB (1988) Behavioral responses of western corn rootworm larvae to volatile semiochemicals from corn seedlings. *Journal of Chemical Ecology* **14**: 1523–1539.
- HIBBARD BE & BJOSTAD LB (1990) Isolation of corn semiochemicals attractive and repellent to western corn-rootworm larvae. *Journal of Chemical Ecology* **16**: 3425–3439.

- HIBBARD BE, BERNKLAU EJ & BJOSTAD LB (1994) Long-chain free fatty-acids - semiochemicals for host location by western corn-rootworm larvae. *Journal of Chemical Ecology* **20**: 3335–3344.
- MILLS NJ (1981) The mortality and fat-content of *Adalia bipunctata* during hibernation. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **30**: 265–268.
- VAN HANDEL E (1985) Rapid determination of total lipids in mosquitos. *Journal of the American Mosquito Control Association* **1**: 302–304.
- ZÖLLNER N & KIRSCH K (1962) Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulfophosphovanillin-Reaktion. *Zeitschrift für die gesamte experimentelle Medizin* **135**: 545–561.

III. Erfolgskontrollbericht

1. Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen

Das Vorhaben leistet einen Beitrag zu den Zielen des Forschungsprogramms des Bundes und der Länder Bayern und Baden-Württemberg zur Bekämpfung des Westlichen Maiswurzelbohrers vom 10.03.2009. Der Anwendungszweck, die Rahmenbedingungen und die umrissenen Ziele werden von diesem Vorhaben bedient, weil

- Untersuchungen zu den biologischen Leistungen der Larven des Westlichen Maiswurzelbohrers explizit benannt sind;
- der Schaderreger in Deutschland eingedrungen und seine weitere Ausbreitung zu erwarten ist;
- der enge Zusammenhang von Mortalität/Fitness und Populationsdynamik für Schaderreger zu begründeten Ursache-Wirkung-Hypothesen führt;
- intensive chemische Pflanzenschutzmittelanwendungen gegen Schaderreger und die mögliche Selektion fruchtfolgeresistenter Tiere sicherheitsrelevant sind und damit die Untersuchungen dem Vorsorgegrundsatz entsprechen;
- auch in der Literatur vorgebrachte wissenschaftlich begründete Einwände, nämlich die Übertragbarkeit der an amerikanischen Labortieren gewonnenen Ergebnisse auf die europäischen Bedingungen, berücksichtigt sind.

2. Wissenschaftlich-technisches Ergebnis des Vorhabens, Nebenergebnisse und gesammelte wesentliche Erfahrungen

1. Es wurde analysiert, ob zwischen den verschiedenen Herkunftstypen Unterschiede in der Embryonalentwicklung bestehen. Hierfür wurden die Anteile schlupfbereiter Eier ohne Diapause bestimmt. In den *Diabrotica*-Stämmen der Käfer aus Ungarn bzw. Italien konnte kein Nachweis für eine Entwicklung ohne Diapause erbracht werden. Ohne Kühlung (=Diapause) erfolgte kein Schlupf.
2. Danach wurde Untersuchungen über den Zeitverlauf der post-diapausalen Entwicklung der Eier durchgeführt. Es wurde ermittelt, dass der Schlupf im ungarischen und italienischen Stamm nach 66 Tagen begann, 50% der Eier schlüpft im ungarischen Stamm nach 90 Tagen und im italienischen nach mehr als 133 Tagen. Das Ende des Schlupfes konnte nicht erfasst werden, da die Versuche wegen der stark zunehmenden Verpilzung der Eier nach 140 Tagen abgebrochen werden mussten.
3. In weiteren Laborversuchen wurde die imaginale Entwicklung des Schaderregers untersucht. Hierfür wurde zur Bestimmung biometrischer Daten einzelne Larvenstadien in unterschiedlichen Larvendichten verschiedenen Temperaturen ausgesetzt. Die Variation der Larvendichten hat zum Ziel, durch unterschiedlich ausgeprägte Konkurrenzsituationen und daraus resultierende unterschiedliche Nahrungsversorgung, Tiere unterschiedlicher Größe zu erhalten. Vergleiche der eigenen Werte mit den publizierten Werten zeigten, dass die morphometrischen Daten der Larven des italienischen Stamms denen des nicht-diapausierenden Stamms entsprechen. Die Larven dieser Stämme sind deutlich größer als die ungarischen Tiere. Die Trockengewichte der Larven nehmen mit zunehmender Temperatur zu. Die Erhöhung der Besiedlungsdichte induziert jedoch keinen Effekt auf die Kopfkapselbreite der Larven des nicht-diapausierenden Stamms. Im Gegensatz dazu sind die Kopfkapselbreiten des 1. und 2. Larvenstadiums des ungarischen Stamms bei höherer Besiedlungsdichte kleiner. Zwischen dem Gewicht der Larven und der adulten Käfer ließen sich direkte Zusammenhänge nachweisen. Da sich im nicht-diapausierenden Stamm die größeren Larven entwickelten, bildeten diese dann die größeren adulten Käfer, die auch eine höhere Fruchtbarkeit besaßen.
4. Die Wirtsfindung bzw. Orientierung der Larven im Boden konnte in Laborversuchen in Nicht-Wahl- und in Wahl-Situationen analysiert werden. Es wurde deutlich, dass die Versuchsdauer durch Nutzung des 1. Larvenstadiums reduziert werden kann. Die

Versuche zeigen, dass auch Pflanzen die nicht zum Wirtsspektrum gehören eine anlockende Wirkung auf die Larven haben. Für die Untersuchung der Orientierung des ersten Larvenstadiums im Boden waren chemische Analysen erforderlich, die als Dienstleistung durch das STZ Soil Biotechnology erbracht wurden. Die vom STZ gewonnenen Ergebnisse der bodenkundlichen Analysen lassen die Bedeutung der Dihydroxystearinsäure für die Orientierung der *Diabrotica*-Larven vermuten. Dabei ist zu berücksichtigen, dass von den Pflanzen produzierte/freigesetzte Inhaltsstoffe sehr wohl unterschiedliche Funktionen für die verschiedenen Herbivoren haben können.

5. Für die Modellierung der Populationsdynamik von *D. v. virgifera* ist die Fähigkeit der Larven, Futtermangel zu überstehen, eine wichtige Größe. Deshalb wurden Laborversuche durchgeführt, in denen Tiere des ersten Larvenstadiums nach Bestimmung ihres Ausgangsgewichts unterschiedlichen Hungerperioden ausgesetzt und danach die Anzahl der Überlebenden und deren biologische Leistung (Gewicht) bestimmt wurden. Die Überlebensrate der Larven nimmt mit zunehmender Hungerperiode (und anschließender Fütterung für 2 Tage) zu. Eine Hungerperiode von 1,816 Tagen (bzw. ein Trockengewicht von 0,2012 mg) induziert eine Überlebensrate von 0,02 (=50% Mortalität).

3. Fortschreibung Verwertungsplan

War nicht vorgesehen.

Wissenschaftliche Erfolgsaussichten

Die Ergebnisse wurden zum Teil auf internen Veranstaltungen im Rahmen des Projektes vorgestellt. Mitarbeiter von Pflanzenschutzdiensten wurden mit den Möglichkeiten der Methoden vertraut gemacht.

Anschlussfähigkeit

Die erzielten Ergebnisse und gewonnenen Erfahrungen könnten die Grundlage für ein weiterführendes Vorhaben bilden, in dem die mögliche *Diabrotica*-Resistenz von Maissorten aus Südamerika verifiziert und der wirkende Mechanismus untersucht wird. Es wäre für den europäischen Maisanbau extrem bedeutsamen, wenn es gelänge, diese Resistenz züchterisch nutzbar zu machen.

4. Arbeiten, die zu keiner Lösung geführt haben

Bis auf eine Aktivität, führten alle angestrebten Arbeiten zum gewünschten Erfolg. Negativ war, dass aufgrund der geringen Größe der Larven von *Diabrotica* die Fettgehaltsbestimmungen der Tiere nicht durchgeführt werden konnten. Die Differenzgewichte (Trockengewicht der nicht entfetteten Larven abzüglich des Trockengewichts entfetteter Larven) der Tiere lagen unterhalb der Messgenauigkeit der zur Verfügung stehenden Mikrowaage. Zusätzlich wurde eine Sulpho-Vanillin Reaktion eingesetzt, die eine Bestimmung des Fettgehalts auf chemisch-optischem Weg erlauben soll (VAN HANDEL, 1985; ZÖLLNER & KIRSCH, 1962). Diese Methode gestattete jedoch in Abhängigkeit vom eingesetzten „Kalibrierungsöl“ (Rapsöl, Sonnenblumenöl, technische Öle) nur eine relative Quantifizierung des Fettgehaltes. Da diese Werte nicht im Bezug zum Feucht- bzw. Trockengewicht gewonnen werden konnten, wurden diese Analysen nicht weitergeführt. Das Tiermaterial wird aber gefrostet (-80°C) gelagert und soll gewogen werden, sobald der Projektnehmer Zugriff auf eine ultrafeine Waage bekommt.

5. Präsentationsmöglichkeiten

Es ist vorgesehen, die Ergebnisse der Untersuchungen auf nationalen und internationalen Veranstaltungen zu präsentieren. In Vorbereitung sind drei Veröffentlichungen in Fachzeitschriften. Es ist auch vorgesehen, nicht nur den mit *Diabrotica* arbeitenden Fachleuten die Resultate dieser vom BLE geförderten Untersuchungen vorzustellen, sondern auch interessierten Landwirten und Beratern.

6. Einhaltung Ausgaben-und Zeitplanung

Der Ausgabenplan wurde eingehalten. Unter Berücksichtigung der kostenneutralen Verlängerung wurde der Zeitplan ebenfalls eingehalten. Die kostenneutrale Verlängerung wurde am 12.02.2012 beantragt, weil Pilzbefall des Saatgutes der Futterpflanzen und eine Infektionen des genutzten Substrats mit Milben (Acari) und Trauermücken (Sciaridae) 2011 zu einem stark reduzierten und asynchronen Schlupf der adulten Käfer mit erhöhter Größenvariation und geringerer Lebensdauer/Fruchtbarkeit sowie zu einer drastischen Reduktion der abgelegten Eier führten. Die Verschleppung von Milben und Trauermücken in Eiablage-Schalen verursachte zusätzlich eine erhöhte Mortalität des Ei-Stadiums der nächsten Generationen. Dies betraf insbesondere die diapausierenden Stämme, deren Eier zur Synchronisation des Larvenschlupfes vier bis fünf Monate bei <math><10\text{ }^\circ\text{C}</math> in Klimaschränken gelagert wurden. Um die geplanten Versuche dennoch durchführen zu können, wurde um eine kostenneutrale Verlängerung gebeten und vom PTJ gewährt.

Unterschriften

Sagerheide, den 12.09. 2012

Dr. T. Thieme
Projektleiter

IV. Kurzfassung

Ziel des Projektes war es, Daten als Grundlage für die Modellierung und Erstellung von Prognosen zum Auftreten und zur optimalen Bekämpfung von *Diabrotica v. virgifera* zu erarbeiten. Verfügbare Vorhersagemodelle für *Diabrotica* beruhen insbesondere auf Ergebnissen aus den USA. Zwischen amerikanischen nicht-diapausierenden Tieren und den in Europa auftretenden Populationen bestehen jedoch z. T. erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Fitness und Mobilität, die für die Treffsicherheit von Prognosen von erheblicher Bedeutung sind und für die Berechnung von Temperatursummen für Prognosezwecke genutzt werden können. Für eine derartige Prognose in Deutschland wurden biologische Daten von in Europa auftretenden *Diabrotica v. virgifera* erarbeitet:

- Embryonalentwicklung der Eier
- Post-diapausalen Entwicklung der Eier
- Einflusses unterschiedlicher Temperaturen und Individuendichten auf die Entwicklung der Larven
- Wirtsfindung/Orientierung der Larven im Boden
- Hungerfähigkeit von Larven

Die für die Untersuchungen über die Orientierung der Larven im Boden erforderlich chemischen Analysen wurden von der STZ Soil Biotechnology durchgeführt.

Die durchgeführten Untersuchungen demonstrieren, dass die in den USA gewonnenen Daten aus Versuchen mit nicht-diapausierenden Laborstämmen des Quarantäneschaderregers *Diabrotica v. virgifera* nur bedingt auf die Situation in Europa übertragbar sind. Die Untersuchungen über die Entwicklung der Eier, Larven und Imaginalstadien liefert Daten über die Biologie, die für die Modellierung der Populationsdynamik des Schaderregers genutzt werden sollen. Sie erlauben die gezielte Bewertung des Schadpotentials von *Diabrotica v. virgifera* und können Grundlage für die verbesserte Regulierung/Bekämpfung des Schaderregers bilden.

IV. Abstract

The objective of this project was to provide data that could be used to produce a model for forecasting the occurrence of *Diabrotica v. virgifera*. The forecasting model currently available is mainly based on results from American studies using non-diapausing beetles, but the biological performance (fitness and mobility) of American non-diapausing beetles and those of European origin could differ, which would affect the accuracy of this model in Europe. Thus, in order to increase the accuracy of this model the parameters used must be based on studies on *Diabrotica v. virgifera* of European origin.

The following aspects of the biology of *Diabrotica v. virgifera* occurring in Europe were studied:

- Embryonic development of eggs
- Post-diapause development of eggs
- Effects of different temperatures and densities of animals on the development of larvae
- Host finding/orientation of larvae in soil
- Ability of larvae to survive starvation

The chemical analyses of the substances used by larvae for locating host plants in soil were done by STZ Soil Biotechnology.

The results indicate that the American data based on studies on non-diapausing strains of *Diabrotica v. virgifera* are of only limited use for forecasting the occurrence of this pest in Europe. In particular, the results obtained on the development of eggs, larvae and adults provide information about this species biology that should be used to model the population dynamics of this pest. They provide a means of evaluating the potential damage that *Diabrotica v. virgifera* can cause and the basis for an improved regulation/control of this pest.

Acknowledgements: The study was financially supported by the Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft, Germany