

Susanne Kögel
Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau

Risikoabschätzung von
Harmonia axyridis,
dem Asiatischen Marienkäfer,
für den Deutschen Obst- und
Weinbau



Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut

Kontakt:

Susanne Kögel
Kurweg 36
67316 Carlsberg
Tel.: 017621198752
E-Mail: susanne.koegel@gmail.com

Die Schriftenreihe „Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut“ veröffentlicht Doktorarbeiten, die in enger Zusammenarbeit mit Universitäten an Instituten des Julius Kühn-Instituts entstanden sind oder herausragende eigenständige Arbeiten aus den Forschungsgebieten des JKI darstellen.

Der Vertrieb dieser Monographien erfolgt über den Buchhandel (Nachweis im Verzeichnis lieferbarer Bücher - VLB) und OPEN ACCESS im Internetangebot www.jki.bund.de Bereich Veröffentlichungen.

Wir unterstützen den offenen Zugang zu wissenschaftlichem Wissen.
Die Dissertationen aus dem Julius Kühn-Institut erscheinen daher OPEN ACCESS.
Alle Ausgaben stehen kostenfrei im Internet zur Verfügung:
<http://www.jki.bund.de> Bereich Veröffentlichungen

We advocate open access to scientific knowledge. Dissertations from the Julius Kühn-Institut are therefore published open access. All issues are available free of charge under <http://www.jki.bund.de> (see Publications).

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation
In der Deutschen Nationalbibliografie: detaillierte bibliografische
Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

ISBN 978-3-930037-94-0

Herausgeber / Editor

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen, Quedlinburg, Deutschland
Julius Kühn-Institut, Federal Research Centre for Cultivated Plants, Quedlinburg, Germany

© Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen sowie der genannten Universität, 2012.

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersendung, des Nachdrucks, des Vortrages, der Entnahme von Abbildungen, der Funksendung, der Wiedergabe auf fotomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten.

Diplom - Biogeographin Susanne Kögel

vom Fachbereich VI Geographie/Geowissenschaften der Universität Trier zur Verleihung des akademischen Grades 'Doktor der Naturwissenschaften' (Dr. rer. nat.) genehmigte Dissertation:

**RISIKOABSCHÄTZUNG VON *HARMONIA AXYRIDIS*, DEM
ASIATISCHEN MARIENKÄFER, FÜR DEN DEUTSCHEN OBST- UND
WEINBAU**

**RISK ASSESSMENT FOR THE MULTICOLORED ASIAN LADYBIRD BEETLE
HARMONIA AXYRIDIS IN GERMAN FRUIT CROPS AND VITICULTURE**

Betreuer: Prof. Dr. Martin Paulus

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Paulus
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Emmerling

Datum der wissenschaftlichen Aussprache: 24.08.2012



Siebildingen, 28.08.2012

Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist in der Zeit von September 2009 bis Juni 2012 am Julius Kühn – Institut (JKI) für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau in Siebeldingen im Rahmen des Forschungsprojektes “Grundlagen für ein Management des Asiatischen Marienkäfers *Harmonia axyridis* im Weinbau” entstanden. Gefördert wurde das Projekt durch den Forschungsring des deutschen Weinbaus (FDW), für dessen finanzielle Unterstützung ich sehr dankbar bin.

Mein besonderer Dank gilt meinen beiden Betreuern vor Ort, Dr. Christoph Hoffmann und Dr. Jürgen Gross, für die stetige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während meiner Forschung.

Ebenso gilt mein besonderer Dank meinen beiden Professoren, apl. Prof. Dr. Martin Paulus und apl. Prof. Dr. Christoph Emmerling, für die universitäre Betreuung der Arbeit, für Ihre Unterstützung und das Einräumen von Freiräumen bei der thematischen Auswahl der Promotion.

Allen beteiligten Mitarbeitern des JKI, Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau, des Instituts für Rebenzüchtung in Siebeldingen, dort insbesondere der Analytik und der Versuchskellerei, den Mitarbeitern des Instituts für Vorratsschutz in Quedlinburg, dort besonders Herrn Dr. Detlef Ulrich, sowie den Mitarbeitern der Abteilung „Chemische Ökologie“ des Instituts für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau am Standort Dossenheim danke ich für die Hilfe und Unterstützung in Labor und Gelände. Prof. Dr. Michael Fischer danke ich für seine stete und schnelle Hilfestellung und Diskussionsbereitschaft.

Den Mitarbeitern am Geilweilerhof danke ich für die freundliche Aufnahme am Standort und die schöne Zeit, die wir zusammen verbringen durften.

Im Besonderen danke ich meinen Eltern, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg und auch in der Promotionszeit immer unterstützt haben. Und letztendlich meiner Schwester für das „auf den Weg bringen“ der Arbeit.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Zusammenfassung	X
Summary	XII
1 Einleitung.....	1
1.1 Stand des Wissens. Untersuchungsobjekt: Der Asiatische Marienkäfer <i>Harmonia axyridis</i>	2
1.1.1 Biologie und Ökologie der Art	2
1.1.2 Einführung und Ausbreitung.....	5
1.1.3 Bedeutungen als invasive Art.....	6
1.1.3.1 Nützlich zur Blattlausbekämpfung	6
1.1.3.2 Schädling im Weinbau.....	7
1.1.3.3 Konkurrent von einheimischen Arten.....	8
1.1.3.4 Lästling in Wohngebieten	9
1.2 Untersuchungszeitraum und Untersuchungsgebiet.....	9
1.3 Zielsetzung/ Leitfragen der Arbeit.....	10
2 Der „Marienkäferton“ als Fehlton im Wein	11
2.1 Sensorische Wahrnehmungsschwelle des Marienkäfertons	13
2.1.1 Sensorische Wahrnehmungsschwelle des Marienkäfertons (Käfer/ kg) in der weißen Traubensorte ‚Riesling‘	14

2.1.2	Sensorische Wahrnehmungsschwelle des Marienkäfertons (Käfer/ kg) in der roten Traubensorte ‚Spätburgunder‘	15
2.1.3	Sensorische Wahrnehmungsschwelle des Marienkäfertons (ng IPMP/ L) in ‚Riesling‘ und ‚Spätburgunder‘	17
2.2	Lösungsansätze zur Verminderung des Marienkäfertons im Wein.....	18
3	Methoxy-pyrazine in der Hämolymphe von Coccinelliden.....	21
3.1	Etablierung einer Methode zur Messung von Methoxy-pyrazingehalten in der Hämolymphe von Coccinelliden	22
3.2	Geruchsrelevante Methoxy-pyrazine in der Hämolymphe von <i>H. axyridis</i> und <i>C. septempunctata</i>	25
3.3	Der Einfluss von Futter auf die IPMP-Gehalte in der Hämolymphe von <i>H. axyridis</i> und <i>C. septempunctata</i>	31
3.4	Die geruchsrelevante Substanz des Marienkäfertons im Wein	36
4	Das Vorkommen von <i>Harmonia axyridis</i> in unterschiedlichen Kulturen innerhalb von Süd-West-Deutschland	38
4.1	Einfluss der Fallenfarbe und Fangmethode auf den Fangerfolg von <i>H. axyridis</i> , <i>C. septempunctata</i> und <i>Propylea quatuordecimpunctata</i>	40
4.2	Abundanz der Marienkäferarten <i>H. axyridis</i> , <i>C. septempunctata</i> und <i>P. quatuordecimpunctata</i> in Obst- und Feldkulturen	44
4.3	Einfluss der landwirtschaftlichen Kulturbedingungen auf das Auftreten von <i>H. axyridis</i> in den Weinbergen	50
4.4	<i>H. axyridis</i> als Antagonist der Reblaus <i>Daktulosphaira vitifoliae</i>	55
5	Schlussfolgerung	63
6	Literaturverzeichnis.....	66
7	Veröffentlichungen der Dissertation.....	82

7.1	Internationale Journals	82
7.2	Fachzeitschriften	82
7.3	Vorträge.....	83
7.4	Poster	84
8	Anhang	85

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Verschiedene Morphotypen des Asiatischen Marienkäfers *H. axyridis*: a) der schwarze Morphotyp *H. axyridis spectabilis*; b+c) der orange Morphotyp mit vielen bzw. ohne Punkten *H. axyridis succinea*..... 3
- Abbildung 2: Ausprägung des Marienkäfertons bei 1 Käfer/ L und 10 Käfer/ L im Vergleich zu Wein ohne Käferbelastung (aus Riesen 2008)..... 12
- Abbildung 3 a+b: Sensorische Wahrnehmung des Marienkäfertons von den Panelpersonen [%] (n=10) bei unterschiedlichen Mengen an Käfer/ kg Rieslingtrauben (a) und Spätburgundertrauben (b). Beim Spätburgunder sind die unterschiedlichen Gärverfahren Maischegärung (rotes Quadrat) und Maischeerhitzung (orangene Raute) getrennt dargestellt. Der Schwellenwert, bei der 50 % der Panelpersonen den Ton erkannt haben, ist als Linie gekennzeichnet. Die logarithmische Trendlinie gibt den theoretischen Verlauf an..... 16
- Abbildung 4: Sensorische Wahrnehmung des Marienkäfertons von den Panelpersonen [%] (n=10) bei unterschiedlichen Mengen an ng/ L Rieslingwein (Raute) und Spätburgunderwein (Viereck). Der Schwellenwert, bei der 50 % der Panelpersonen den Ton erkannt haben, ist als Linie gekennzeichnet. Die logarithmische Trendlinie gibt den theoretischen Verlauf an..... 18
- Abbildung 5 a+b: Der Einfluss von Pressdruck (a) [in bar] und Pressdauer (b) [in min] auf die Mortalität von *H. axyridis* [in %] in der Weinpresse. Eine lineare Trendlinie ist eingefügt..... 19
- Abbildung 6: Die drei relevanten Methoxypyrazine in der Hämolymphe von *H. axyridis*: 2-Isopropyl-3-Methoxypyrazin (IPMP), 2-Secbutyl-3-Methoxypyrazin (SBMP) und 2-Isobutyl-3-Methoxypyrazin (IBMP). 21
- Abbildung 7: Chromatogramm einer H₂O-Lösung gemischt mit den Reinsubstanzen IPMP, IPEP, SBMP und IBMP. Die Probenvorbereitung fand mittels hs-SPME statt und die Trennung mit einem GC-MS. 24

- Abbildung 8: Rangsumme (in % der maximalen Intensität an MKT (Marienkäfer) im Vergleich zur Kontrolle) von Weinen belastet mit *H. axyridis* bzw. *C. septempunctata* (8 bzw. 16 Käfer/ L) ermittelt durch eine Weinprobe mit 10 Panelpersonen. Die Standardabweichung ist angegeben. 26
- Abbildung 9: Häufigkeit [%] der Methoxypyrazine IPMP, SBMP und IBMP in der Hämolymphe von *C. septempunctata* und *H. axyridis* (jeweils n=50). 27
- Abbildung 10: Häufigkeit der erkannten geruchsaktiven Substanzen (NIF = Nasal Impact Frequency) [%] in der Hämolymphe von *H. axyridis* (A) und *C. septempunctata* (B) mit Marienkäfer-ähnlicher Beschreibung bei definierten Retentionszeiten im GC-O. Die drei Methoxypyrazine IPMP, SBMP und IBMP sind gekennzeichnet. 28
- Abbildung 11: Chromatogramm der Hämolymphe von *C. septempunctata* (A) und *H. axyridis* (B) mit GC-NPD. Alle Peaks bei definierter Retentionszeit [min] mit einer Fläche > 10.000 pA sind nummeriert. Die Peaks der Methoxypyrazine IPMP, SBMP und IBMP sind beschriftet. (aus Kögel et al. 2012b)..... 29
- Abbildung 12: IPMP-Gehalte von *H. axyridis* (unterteilt in die Unterarten *H.a. succinea* mit Punkten, *H.a. succinea* ohne Punkte und *H.a. spectabilis*) und *C. septempunctata* bei drei verschiedenen Fütterungsvarianten (*A. pisum*, *A. pisum* + Traubensaft und *E. kuehniella*-Eier). Die Großbuchstaben geben signifikante Unterschiede einer Art zwischen den Fütterungsvarianten an. Die Kleinbuchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Arten bzw. Unterarten innerhalb einer Fütterungsvariante ($p < 0,05$). 33
- Abbildung 13: IPMP-Gehalte (ng/ g Käfer) von *H. axyridis* +/- Standardfehler als Puppe auf den angegebenen Pflanzen mit definierten Läusen (*M. varians* auf *P. persica* (n=5); *B. helichrysi* auf *P. domestica* (n=7); *D. plantaginea* auf *M. domestica* (n=9); *D. platanoidea* auf *A. platanoidea* (n=5); *A. hederæ* auf *H. helix* (n=5); *A. sambuci* auf *S. nigra* (n=5); Unbekannte Lausarten auf *P. spinosa*, *P. mahaleb*, *P. cerasus* und *C. avellana* (n=5)) gesammelt und 3 Tage nach Schlupf ohne weiteres Futter analysiert. Die

	Großbuchstaben geben signifikante Unterschiede an (LSD-Test; $p < 0,05$).	34
Abbildung 14:	Häufigkeit der erkannten geruchsaktiven Substanzen (NIF = Nasal Impact Frequency) [%] in Kontrollwein (A) und Käferwein (10 <i>H. axyridis</i> /kg Trauben) (B) bei definierten Retentionszeiten im GC-O. Die zwei Methoxypyrazine IPMP und IBMP sind gekennzeichnet.....	37
Abbildung 15:	Auftreten von <i>H. axyridis</i> [%] zum einen im Weinberg und zum anderen in der Presse in den Weinbauregionen Pfalz und Mosel. Umfrageergebnis von je 50 Weinbaubetrieben.....	39
Abbildung 16:	Anzahl an Käfern pro Falle [5 Fallen/Woche/6 Monate] gefangen auf Leimfallen des gleichen Typs, aber mit unterschiedlicher Farbe (gelb, grün, rot, blau, weiß) in einem Weinberg in Siebeldingen in den Jahren 2010 und 2011. Die Kleinbuchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Arten innerhalb der Farbe an. Signifikante Unterschiede zwischen den Farben sind mit Großbuchstaben gekennzeichnet. ANOVA LSD-Test $p < 0,05$. Angegeben sind der Median und der Quartilsabstand.	42
Abbildung 17:	Individuen von <i>H. axyridis</i> , <i>C. septempunctata</i> und <i>P. quatuordecimpunctata</i> (MW/ Woche/ 20 Wochen) gefangen in einer Apfelanlage der Sorte „Topaz“ in 2010 (unterer Balken) und 2011 (oberer Balken) am JKI Dossenheim zum einen mittels Klopfprobe und zum anderen mittels Gelbtafeln (die Daten der Gelbtafel sind identisch zu den Daten in Abbildung 18 und werden nur zur besseren Visualisierung nochmal dargestellt). Die Buchstaben geben signifikante Unterschiede zwischen den Fangmethoden aber innerhalb einer Art und eines Jahres an (Mann-Whitney-U-test, $p < 0,05$).	43
Abbildung 18:	Individuen von <i>H. axyridis</i> , <i>C. septempunctata</i> und <i>P. quatuordecimpunctata</i> pro Falle (Mittelwert aus 5 Fallen in 2010 bzw. 10 Fallen in 2011/Woche in 26 Wochen) in einer Pfirsichanlage (orange), Apfelanlage (grün) und im Weinberg (blau) in 2010 und 2011. Die Kleinbuchstaben geben signifikante Unterschiede zwischen den Kulturen innerhalb einer Art und eines Jahres an. Die Großbuchstaben	

kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Arten innerhalb einer Kultur und eines Jahres. LSD-test $p < 0,05$	46
Abbildung 19: Prozentualer Anteil von Krankheiten an Trauben, an denen <i>H. axyridis</i> fressend beobachtet wurde. n = 54 Rebstöcke.....	47
Abbildung 20: Individuen von <i>H. axyridis</i> , <i>C. septempunctata</i> und <i>P. quatuordecimpunctata</i> pro Falle (Mittelwert aus 5 Fallen in 2010 bzw. 10 Fallen in 2011 / Woche in 12 Wochen) in einem Sudangrasfeld (braun), Sonnenblumen (gelb) und in Mais (grün) in 2010 und 2011. Die Kleinbuchstaben geben signifikante Unterschiede zwischen den Kulturen innerhalb einer Art und eines Jahres an. Die Großbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Arten innerhalb einer Kultur und eines Jahres. ANOVA LSD-test $p < 0,05$	48
Abbildung 21 a+b: Die Landnutzung in den Weinanbaugebieten Pfalz (Deutschland), Niagara Peninsula (Great Lakes-Region, Niagara-Halbinsel, Nordamerika) und Napa Valley (Kalifornien, Nordamerika) als Anteil an der gesamten Landfläche (a). Der Anteil einzelner Kulturen innerhalb der landwirtschaftlich genutzten Fläche ist in b dargestellt.	51
Abbildung 22: Fraßleistung [%] von <i>H. axyridis</i> (grau) und <i>C. septempunctata</i> (rot) innerhalb von 24 h von einer definierter Anzahl an <i>D. vitifoliae</i> Eiern (100, 200, 500, 1000, 2000, 3000 und 4000 Eier/Petrischale für <i>H. axyridis</i> beziehungsweise 10, 20, 50, 100, 200, 500 Eier/Petrischale für <i>C. septempunctata</i>).....	57
Abbildung 23a-d: Infizierung der Blätter mit Blattgallen von <i>D. vitifoliae</i> . Einteilung in Kategorien nach den Richtlinien des Bundessortenamts beurteilt: Kat. 1-2 (a); Kat. 3-5 (b); Kat. 6-7 (c) und Kat. 8-9 (d).....	60
Abbildung 24: Anzahl an Individuen von <i>H. axyridis</i> pro Woche (bonitiert über 12 Wochen im Jahr 2011) auf Reben mit den einzelnen Reblauskategorien 1-2, 3-5, 6-7 und 8-9 innerhalb einer Rebparzelle am JKI Siebeldingen. Die Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Kategorien. SD und Quartile sind dargestellt.	61
Abbildung 25: Anzahl gefangener Individuen von <i>H. axyridis</i> [in % an insgesamt gefangenen Individuen] (Y-Achse) und bonitierter Befall von	

Reblausblattgallenanzahl [MW der Befallsstärke, Kategorien 1-9] (z-Achse) pro Fangtag im Zeitraum von Juli bis September 2011. Die Kategorieneinteilung ist Abbildung 23 zu entnehmen. 62

Abkürzungsverzeichnis

BISZ	Beratung und Information für den süddeutschen Zuckerrübenanbau
bzw	beziehungsweise
°C	Grad Celcius
cm	Zentimeter
DLR	Dienstleistungszentrum Ländlicher Raum
E	Ost (East)
g	Gramm
GC	Gaschromatograph
h	Stunde
H ₂ O-bidest	Zweifach destilliertes Wasser
HS-SPME	headspace-Solid Phase Micro Extraction
IBMP	2-Isobutyl-3-Methoxypyrazin
IPEP	3-Isopropyl-2-Ethoxypyrazin
IPMP	2-Isopropyl-3-Methoxypyrazin
JKI	Julius Kühn-Institut
Kat.	Kategorie
kg	Kilogramm
L	Liter
L/D	Licht/Dunkel
LF	Luftfeuchte
LSD	Least Significant Difference
MKT	Marienkäferton
m ²	Quadratmeter

mg	Milligramm
mL	Milliliter
min	Minuten
Mio.	Millionen
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometer
MW	Mittelwert
N	Nord
n	Anzahl an Wiederholungen
NaCl	Natriumchlorid
NIF	Nasal Impact Frequency
ng	Nanogramm
NPD	Stickstoff-Phosphor-Detektor
O	Olfactory Detection Port
OMAFRA	Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs
p	Signifikanzwert
pA	Pico-Ampere
SBMP	2-secbutyl-3-methoxypyrazin
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
SL	Suitability Parameter
USDA	United States Department of Agriculture
%	Prozent
µm	Mikrometer

Zusammenfassung

Der Asiatische Marienkäfer *Harmonia axyridis* ist als invasive Art in Europa flächendeckend verbreitet. In Nordamerika, wo sich der Käfer ebenfalls etablieren konnte, kam es im Jahre 2001 durch den Käfer zu erheblichen Beeinflussungen des Weingeschmacks (Marienkäferton), nachdem diese mit ins Lesegut gelangten.

Als prägende Geruchssubstanz des Marienkäfertons im Wein und in der Hämolymphe von *H. axyridis* konnte 2-Isopropyl-3-Methoxy-pyrazin (IPMP) mittels gaschromatographischen Analysen identifiziert werden. Anders als in einer früheren Publikation von Cudjoe et al. (2005) angenommen, haben *H. axyridis* und der 7-Punkt-Marienkäfer *Coccinella septempunctata* im Hinblick auf die IPMP-Gehalte in der Hämolymphe ein ähnlich hohes Risikopotential den Wein zu verunreinigen. In der vorliegenden Studie konnten sowohl in *H. axyridis* als auch *C. septempunctata* Gehalte zwischen 2-12 ng IPMP/ g Käfer gemessen werden. Dabei wurde ein Zusammenhang zwischen dem während der Larvalentwicklung aufgenommenen Futter sowie der Elytrenfarbe von *H. axyridis* und den IPMP-Gehalten im Käfer festgestellt. Schlecht verwertbare Blattläuse als Nahrungsquelle führten zu geringeren IPMP-Gehalten als bei einer Ernährung mit solchen, die ein optimales Futter für *H. axyridis* darstellen. Des Weiteren hatte der orange Morphotyp *H. axyridis succinea* mit deutlich erkennbaren schwarzen Punkten auf den Elytren signifikant höhere IPMP-Gehalte als der schwarze Morphotyp *H. axyridis spectabilis*. In der Hämolymphe von *C. septempunctata* konnte zusätzlich 2-Isobutyl-3-Methoxy-pyrazin (IBMP) als weiteres geruchsintensives Methoxy-pyrazin neben IPMP gemessen werden. In *H. axyridis* kam IBMP in geringerer Intensität vor.

Gelangt *H. axyridis* ins Lesegut, spielt vorwiegend das Gärverfahren bei der Ausprägung des Marienkäfertons im Wein eine bedeutende Rolle. Die sensorische Wahrnehmungsschwelle (für 50 % der Testpersonen erkennbar) bei der Traubensorte ‚Riesling‘ ohne Maischegärung war 5 Käfer/ kg. In der roten Traubensorte ‚Pinot noir‘ lag die sensorische Wahrnehmungsschwelle in maischeerhitzten Trauben bei 6 Käfer/ kg Trauben und in maischevergorenen Trauben bei 3 Käfer/ kg Trauben. Demzu-

folge kann eine Maischeerhitzung statt Maischegärung der Trauben den Fehlton im Wein verringern. Lösungsansätze zur Reduktion des Marienkäfertons sind auch in weiteren Schritten des Weinbereitungsverfahrens zu sehen: Eine kurze Pressdauer (< 60 min) und ein niedriger Pressdruck (< 2 bar) konnten zu einer Verminderung des Fehltons beitragen beziehungsweise das Zerquetschen der Tiere in der Weinpresse reduzieren.

Zum Monitoring des aktuellen Bestandes von *H. axyridis* in landwirtschaftlichen Kulturen eignete sich die Klopfprobe besser als gelbe Leimtafeln. Große Marienkäferarten, wie *H. axyridis*, können sich leichter vom Leim befreien als kleinere Arten und so kann es durch Leimfallen zu einer Unterschätzung der Populationsgröße von *H. axyridis* kommen und zu einer Überschätzung der Abundanz kleinerer Marienkäferarten wie dem 14-Punkt-Marienkäfer *Propylea quatuordecimpunctata*. Dennoch wurde bereits in den Jahren 2010 - 2011 *H. axyridis* im Vergleich zu *C. septempunctata* und *P. quatuordecimpunctata* am häufigsten mit Hilfe von Leimfallen an den Standorten Siebeldingen und Dossenheim gefangen.

Einen positiven Einfluss auf mit der Blattrauben befallene Reben hatte *H. axyridis* im Spätsommer. Zu dieser Zeit kann er als Antagonist der Reblaus *Daktulosphaira vitifoliae* dienen und damit die Populationsgröße dieses Schädling für den europäischen Weinbau senken. Dabei stellt die Blattrauben hinsichtlich der Entwicklungsparameter, wie Entwicklungsdauer und Adultgewicht, kein optimales Futter für die Art dar. *H. axyridis* spielt jedoch somit für den deutschen Weinbau eine ambivalente Rolle als Schädling und Nützling zugleich.

Summary

The Multicolored Asian ladybird beetle *Harmonia axyridis* is an invasive species originating from East Asia. It was introduced to North America and Central Europe as a biological control agent. *H. axyridis* has spread all over these countries and has the capability to become an increasing problem for winegrowers. The Asian ladybird beetle feeds on damaged fruits in late summer and in autumn, especially on grapes. By being harvested and processed together with the grapes, it causes an off-flavor in the wine, the so-called 'ladybird taint' (LBT), due to the release of hemolymph (containing mainly methoxypyrazines) into the must.

Sensory trials on wines produced in 2009 with added live beetles of *H. axyridis* showed that the LBT is detectable at a threshold level of 5 beetles/ kg where beetles were added to white 'Riesling' grapes. Modifications in wine processing conditions can reduce the LBT in wines. The sensory detection of LBT depends on the wine-making practices: the threshold level for crushed must fermented grapes was 3 beetles/ kg of 'Pinot noir' grapes compared to a threshold level of 6 beetles/ kg of 'Pinot noir' grapes that were must heat. In addition, the crushing of beetles in the wine press, and therefore the input of hemolymph into the must, can be reduced at pressures less than 2 bar and duration of pressing shorter than 60 minutes.

Cudjoe et al. (2005) found that *H. axyridis* has a hundred-fold higher quantity of pyrazines in hemolymph than the 7-spot ladybird beetle *Coccinella septempunctata*. Interestingly, in our study, the wines contaminated by 7-spot ladybird beetle showed a significantly higher intensity of off-flavors than the wines contaminated by *H. axyridis*. Further analysis using headspace solid phase micro extraction (HS-SPME), gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS), and GC-olfactometry (GC-O) showed, that in relation to *C. septempunctata*, the Multicolored Asian ladybird beetle had more nitrogen containing compounds in the hemolymph, mainly IPMP and 2-sec butyl-3-methoxypyrazine (SBMP). IPMP was detected as the main odor-active compound in both ladybird beetle species. 2-isobutyl-3-methoxypyrazine (IBMP), which occurred at a much lower frequency in *H. axyridis*, could be identified as a second

intensive odor-active compound of the 7-spot ladybird beetle. SBMP, the second highest measured N-compound of *H. axyridis*, had a lower olfactory active threshold by GC-O-test. *C. septempunctata* contained less SBMP in its hemolymph than *H. axyridis*.

Concentrations of IPMP in *C. septempunctata* and *H. axyridis* were between 2 -12 ng/ g beetle. In field-collected beetles no significant differences between the two species could be observed. Thus, concerning methoxypyrazine concentrations, *H. axyridis* cannot be regarded as more hazardous for viticulture than *C. septempunctata*. But we observed an effect of elytral pigmentation on IPMP concentrations. The *succinea 2* type (orange without dots) had the lowest IPMP concentrations in two out of three feeding regimes compared to the *succinea 1* (orange with dots) type. Depending on diet, IPMP contents differed in both species leading to higher concentrations in *H. axyridis* or *C. septempunctata*. Furthermore, aphid species ingested during larval development significantly affected IPMP content in adult beetles.

For *H. axyridis* and *C. septempunctata* shaking proof is a significantly more efficient field monitoring method than yellow sticky traps. Due to their body size, both species are able to escape from yellow cards and the population size might be underrepresented in data sets –also in the presented data in this study. However, in the years 2010 - 2011 *H. axyridis* were caught at highest abundance in fruit and field crops compared to other ladybird species. *C. septempunctata* and the 14-spot ladybird beetle *Propylea quatuordecimpunctata* were the second most abundant species.

In addition, the invasive species *H. axyridis* was identified as a possible predator of grape phylloxera *Daktulosphaira vitifoliae*, a pest species in viticulture, in the laboratory and under field conditions. Even though grape phylloxera cannot be considered the optimum food for *H. axyridis*, it may represent a preferable food source if other food is rare or lacking in late summer. In conclusion, with regards to viticulture, *H. axyridis* can therefore have an ambivalent role as beneficial and pest insect.

1 Einleitung

„Die Vorstellung, unbekannte Wesen drängen in unsere Welt ein, fasziniert und beängstigt zugleich“ (Kowarik 2003)

Das Zitat von Kowarik (2003) bezieht sich auf eine zunehmende Globalisierung unserer Welt, die auch vermehrt zu biologischen Invasionen führt. Dies bedeutet, dass durch menschliche Aktivitäten auch Bestandteile der Flora und Fauna auf andere Kontinente verschleppt oder eingeführt werden und sich schließlich in Gebieten ausbreiten, die sie zuvor nicht erreicht hätten (Kowarik 2003). Inzwischen sind sehr viele Beispiele hierfür bekannt und es wird von invasiven Arten gesprochen. Dabei kommt es aber auch verstärkt zu negativen Auswirkungen für die heimische Flora und Fauna. Da invasive Arten meist sehr konkurrenzstark sind, kann es zu ökologischen (z.B. Verdrängung einheimischer Arten) aber auch ökonomischen Schäden (z.B. verminderter landwirtschaftlicher Ertrag) kommen.

Ein Beispiel einer biologischen Invasion ist der Asiatische Marienkäfer *Harmonia axyridis*. In der vorliegenden Arbeit wird auf die invasive Art eingegangen und zunächst der bisherige Stand des Wissens dargestellt. Im Anschluss wird sein Gefährdungspotential im Hinblick auf ökonomische Schäden für den Weinbau, aber auch auf ökologische Schäden im Bezug auf die einheimische Marienkäferfauna Deutschlands bewertet. Doch auch positive Aspekte der invasiven Art werden beleuchtet.

1.1 Stand des Wissens. Untersuchungsobjekt: Der Asiatische Marienkäfer *Harmonia axyridis*

1.1.1 Biologie und Ökologie der Art

Der Asiatische Marienkäfer *Harmonia axyridis* (Pallas 1773) gehört zur Familie der Coccinellidae. Diese umfasst insgesamt circa 5000 Arten in sieben Unterfamilien (Sticholotidinae, Tetrabrachinae, Coccidulinae, Scymninae, Chicorinae, Coccinellinae und Epilachninae) (Klausnitzer 1971; Sasaji 1971; Lawrence & Newton 1995). In der Unterfamilie Coccinellinae gehört der Asiatische Marienkäfer zur Gattung *Harmonia*, die weltweit 15 Arten beinhaltet (Hodek 1973). Während die deutsche Bezeichnung einheitlich ist, existieren im anglo-amerikanischen Sprachgebrauch mehrere Bezeichnungen. „Harlequin ladybird“, „Multicolored Asian ladybird“ oder „Halloween beetle“ sind dabei die gebräuchlichsten (Koch 2003).

Die Tiere sind 5-8 mm lang und weisen eine für Marienkäfer typische konvexe Körperform auf (Sasaji 1971; Klausnitzer & Klausnitzer 1997). Die Entwicklung des Asiatischen Marienkäfers ist wie bei allen Käfern holometabol, d.h. es finden sich alle Stadien vom Ei zur Larve über die Puppe zum adulten Käfer (Hodek 1973; Klausnitzer & Klausnitzer 1997). Nach der Paarung legen die Weibchen länglich-ovale, meist leuchtend gelb gefärbte Eier in geschlossenen Gelegen. Aus diesen schlüpfen nach durchschnittlich 2,8 Tagen die Larven, die sich bis zur Verpuppung insgesamt viermal häuten (Koch 2003). Das erste Larvenstadium ist recht einheitlich grau-schwarz gefärbt. Die drei älteren Larvalstadien besitzen seitlich auf dem Rücken je einen leuchtend orange gefärbten Streifen, der vom ersten bis zum fünften Hinterleibssegment reicht. Sie tragen außerdem die für die Gattung *Harmonia* typischen zwei- bis dreifach gegabelten Dornfortsätze auf dem Rücken. Im letzten Larvenstadium können die Larven bis zu 1 cm lang werden. Nach der Verpuppung schlüpfen die adulten Käfer. Die Zeitdauer der Entwicklungsstadien wird von der Temperatur und dem Futter beeinflusst (Pervez & Omkar 2006; Berkvens et al. 2008b).

Die ursprüngliche Verbreitung des Asiatischen Marienkäfers liegt in Nord-Ost Asien, eingeschlossen China, Korea, Japan und Sibirien (Sasaji 1971). *H. axyridis* kann Temperaturen von über 30°C leicht überdauern (Lamana & Miller 1996). Eine Überwinterung ist bei 0 bis -5°C möglich. Erst ab -20°C kommt es zur Mortalität der Käfer (Watanabe 2002).

Die Lebensdauer von *H. axyridis* beträgt bis zu drei Jahren (Savoiskaya 1970). Der Asiatische Marienkäfer ist im Ursprungsgebiet bivoltin, jedoch wurde in den eingeführten Ländern auch Polyvoltinismus festgestellt, bei dem während eines Jahres drei bis vier Generationen pro Jahr auftreten können (Wang 1986; Osawa 1991). Eine obligate Dormanz ist nicht bekannt. Eine fakultative Winterdiapause ist bei Freilandtieren zu beobachten. Teilweise konnte eine Quieszenz im Sommer festgestellt werden (Sakurai et al. 1992). Unter Zuchtbedingungen ist jedoch keine Diapause nötig.



Abbildung 1: Verschiedene Morphotypen des Asiatischen Marienkäfers *H. axyridis*: a) der schwarze Morphotyp *H. axyridis spectabilis*; b+c) der orange Morphotyp mit vielen bzw. ohne Punkte *H. axyridis succinea*

Die Färbung des Asiatischen Marienkäfers ist sehr variabel (Abbildung 1). Die Elytrenfarbe kann orange bis rot mit schwarzen Punkten sein oder auch schwarz mit orangen bis roten Punkten. Ebenso variiert die Anzahl der Punkte von 0 bis 21 (Koch 2003; Kögel 2010). Charakteristisch für die Art ist die M-förmige Zeichnung auf dem

Pronotum (Chapin & Brou 1991). Auch bei der Färbung wird davon ausgegangen, dass es sich um eine Anpassung an Umweltbedingungen handelt: Futter während der Larvalentwicklung (Grill & Moore 1998) sowie die Temperatur während der Verpuppung (Sakai et al. 1974) spielen eine Rolle.

Die Gattung *Harmonia* gehört innerhalb der Coccinellidae zu der Gruppe von Marienkäfern, die Ernährungsgewohnheiten der phytophagen Marienkäfer mit jenen reiner Räuber kombinieren. Als polyphage Art frisst *H. axyridis* zwar vor allem Blattläuse (aphidiphag) (Hodek 1996; Klausnitzer & Klausnitzer 1997), jedoch werden auch eine Vielzahl weiterer Beuteorganismen erfasst. So werden Insekteneier, Blattsauger, Larven anderer Käfer sowie die der eigenen oder verwandten Arten („intraguild-predation“) und auch Schmetterlingsraupen (Koch et al. 2003; Snyder et al. 2004; Pell et al. 2008; Ware & Majerus 2008) erbeutet. Des Weiteren werden Pollen und Nektar sowie zuckerhaltige Fruchtsäfte als Futter genutzt (Lamana & Miller 1996; Berkvens et al. 2008a; Galvan et al. 2008a).

Zur Futterfindung können Strecken bis zu 50 km pro Jahr zurückgelegt werden (Lenteren et al. 2007). Ursprünglich als arborikole Art beschrieben (Hodek 1973; Soares et al. 2008), erweiterte sich ihr Vorkommen in den neu besiedelten Ländern (siehe Kapitel 1.1.2) auch auf Sträucher, krautige Pflanzen, Feldfrüchte, Weinberge, Obstanlagen und urbane Flächen (Musser et al. 2004; Lucas et al. 2007; Finlayson et al. 2008; Galvan et al. 2008a; Ameixa et al. 2011). Jedoch beschreibt eine neuere Publikation von Osawa (2011) ein Vorkommen der Art in seiner ursprünglichen Umgebung auch auf vorwiegend gestörten Flächen wie Agrar- oder urbanen Flächen sowie Obstanlagen.

Natürliche Feinde von *H. axyridis* sind in Europa rar. Gegen potentielle Räuber, wie Baumwanzen (Pentatomidae), Spinnen (Gattung *Misumenops*), Ameisen (Gattung *Solanopsis*) oder andere Marienkäferarten, ist der Käfer offenbar besser verteidigt als andere Coccinellidae (Cottrell & Yeorgan 1998; Dutcher et al. 1999; Yasuda & Kimura 2001). Auch gegen Mikroorganismen ist *H. axyridis* besser verteidigt als beispielsweise der in Europa einheimische *Coccinella septempunctata* (Linné 1758) (Gross et al. 2010). Ein möglicher Parasitoid ist *Dinocampus coccinellae*. Doch auch

hier wurde eine geringere Parasitierung bei *H. axyridis* als bei nordamerikanischen und europäischen Arten beobachtet (Hoogendoorn & Heimpel 2002; Koyama & Majerus 2008). Bakterien, die vor allem die Männchen befallen und zu einer geringeren Befruchtungsrate führen, wurden bei *H. axyridis* wie auch bei nativen Arten gefunden (Riddick et al. 2009; Roy et al. 2011).

1.1.2 Einführung und Ausbreitung

H. axyridis wurde bereits im Jahr 1916 erstmals zur Blattlausbekämpfung nach Nordamerika (Kalifornien), 1982 nach Europa (Südfrankreich) und 1986 nach Südamerika (Argentinien) eingeführt (Chapin & Brou 1991; Ongagna et al. 1993; Coderre et al. 1995; Ferran et al. 1996; Lamana & Miller 1996; Brown & Miller 1998; Saini 2004).

Während er sich direkt nach Einführung nicht einbürgern konnte, hat er begonnen, sich binnen weniger Jahre zuerst in Nordamerika (seit 1988), dann in Europa (seit 1999), in Südamerika (seit 2001) und schließlich in Südafrika (seit 2004) massiv auszubreiten (Chapin & Brou 1991; Tedders & Schaefer 1994; de Almeida & da Silva 2002; Adriaens et al. 2003; Koch 2003; Majerus & Roy 2005; Stals & Prinsloo 2007).

In Europa hat sich *H. axyridis* in den Ländern von Dänemark im Norden bis Frankreich im Süden sowie Tschechien im Osten und Großbritannien im Westen (Brown et al. 2008) erfolgreich etablieren können. Auch wurden bereits aus Norwegen, Griechenland und Spanien Freilandfunde gemeldet (Katsoyannos et al. 1997; Brown et al. 2008; Sathre et al. 2010).

Gründe der starken Ausbreitung in den letzten Jahren sind nicht eindeutig erklärbar. Die globale Klimaerwärmung als möglicher Beschleunigungsfaktor ist auszuschließen, da sich die Art sowohl nach Norden als auch nach Süden ausbreitet. Auch kommt es verstärkt zu Massenansammlungen in nördlicheren Breiten im Gegensatz zu südlicheren Ländern wie Südfrankreich.

Für Mitteleuropa sind 96 einheimische Marienkäferarten beschrieben (Klausnitzer & Klausnitzer 1997). In Deutschland wurden davon bisher 78 native Arten nachgewie-

sen (Klausnitzer & Klausnitzer 1997). Seit 1999 breitete sich *H. axyridis* in Europa als zusätzliche invasive Art aus (Klausnitzer 2002). Die ersten Freilandfunde in Europa stammen aus Belgien und Deutschland, wo er zwischen 1999 und 2001 mehrfach nachgewiesen wurde (Bathon 2002; Klausnitzer 2002; Tolasch 2002). In Frankfurt und Hamburg kam es ausgehend von zwei botanischen Gärten, wo die Art vermutlich als Nützling eingesetzt wurde, 2002 erstmals zu Massenvermehrungen im Herbst. Seitdem hat sich der Käfer weiter ausgebreitet und ist inzwischen in allen Bundesländern vertreten. Wie hoch seine Abundanz in einzelnen Habitaten und Regionen in Deutschland ist, war bisher nicht bekannt. In der vorliegenden Studie sollen dazu Ergebnisse geliefert werden.

1.1.3 Bedeutungen als invasive Art

1.1.3.1 Nützling zur Blattlausbekämpfung

Ursprünglich als biologischer Schädlingsbekämpfer in andere Länder eingeführt, ist der Asiatische Marienkäfer auch weiterhin ein Nützling bei der Reduktion von Blattläusen. Seit seinem Auftreten in Obstanlagen ist der Befall mit Blutlaus (*Eriosoma lanigerum*), der Mehligen Apfelblattlaus (*Dysaphis plantaginea*) und der Grünen Zitrusblattlaus (*Aphis spiraecola*) deutlich zurückgegangen (Brown & Miller 1998; Brown & Mathews 2007; Brown & Mathews 2008; Li et al. 2008; Brown 2011). Bei Feldfrüchten wurde eine Reduktion der Hopfenblattlaus (*Phorodon humuli*) bestätigt (Weihrauch 2008) sowie von *Ostrinia nubilalis* und *Rhopalosiphum maidis* in Mais (Musser & Shelton 2003; Musser et al. 2004; Koch et al. 2006). Sehr effektiv dezimiert *H. axyridis* die Sojalaus *Aphis glycines* in Sojafeldern in Nordamerika (Mignault et al. 2006; Bahlai & Sears 2009; Ragsdale et al. 2011). Der Einfluss von *H. axyridis* auf die Reblaus *Daktulosphaira vitifoliae*, ein bedeutender Schädling für den deutschen Weinbau, war bisher nicht untersucht worden. Eine Antwort auf die Frage, ob der Asiatische Marienkäfer ein Antagonist der Reblaus sein kann, ist Gegenstand dieser Arbeit.

1.1.3.2 Schädling im Weinbau

Im Weinbau kann der Käfer als wirtschaftlicher Schädling fungieren, wenn er nach der Lese mit in den Verarbeitungsprozess der Trauben gelangt. Während des Pressvorgangs kann die Hämolymphe in den Most gelangen. Dies kann zu unerwünschten Fehltonen im Wein führen (Pickering et al. 2004; Galvan et al. 2007). Welchen Einfluss dabei die Rebsorte und das Verarbeitungsverfahren der Trauben haben, war bisher nur aus einzelnen Studien in Nordamerika und der Schweiz bekannt. Deshalb wird in Kapitel 2 auf die Ausprägung des Fehltones im Wein in Deutschland näher eingegangen. Des Weiteren sollen erste Lösungsansätze zur Reduktion des Marienkäfertons im Wein geliefert werden.

Zu wirtschaftlichen Schäden im Weinbau aufgrund des Marienkäfertons kam es erstmals und bisher ausschließlich in der Great Lakes-Region, USA/Kanada (Koch & Galvan 2008; Riesen 2008). Hier trat eine Massenvermehrung von *H. axyridis* erst sieben Jahre (im Jahre 2001) nach der Einführung des Käfers (im Jahre 1994; Tedders & Schaefer 1994; Nalepa et al. 1996; Brown & Miller 1998; Koch 2003) auf. Über das Ausmaß der wirtschaftlichen Schäden ist aus den USA nur wenig bekannt. In Kanada wurden 20 % der Weine, was 2,5 Mio. Liter Wein bedeutet, als belastet gemeldet. Eine Mio. Liter wurde dabei entsorgt und der Rest zu Essig verarbeitet (Riesen 2008). Ähnliche Ausmaße sind in den folgenden Jahren nicht mehr aufgetreten. Vergleicht man diese Verluste mit den Weinmengen in der Weinbauregion Pfalz, Deutschland, so würden 2,5 Mio. Liter einen Verlust von 1 % bedeuten, ein Verlust von 20 % jedoch die Vernichtung von 50 Mio. Liter (253 Mio. Liter in 2007; Stat. Landesamt RLP). 10 Jahre nach dem ersten massenhaften Auftreten von *H. axyridis* in Deutschland (im Jahre 2002) blieben bisher Schäden im Weinbau aus. Im Jahre 2009 konnten jedoch zahlreiche Individuen an vorgeschädigten Trauben in Weinbergen rund um den Geilweilerhof, Siebeldingen, gefunden werden (Kögel 2010) und zahlreiche Winzer berichteten von Käfern in ihrer Weinpresse. Ein wirtschaftlicher Schaden durch den Marienkäfer ist bisher nicht bekannt.

Somit stellte sich die Frage, welche Faktoren nach bisherigem Kenntnisstand das Auftreten von *H. axyridis* und ein Einflug in die Weinberge zur Lesezeit beeinflusst haben und wie hoch das Gefährdungspotential für deutsche Weinbauregionen sein könnte. Denn in anderen Weinbaugebieten Nordamerikas, wie dem größten Weinbaugebiet der USA in Kalifornien, kam es ebenfalls noch zu keinen Schäden oder Massenansammlungen von *H. axyridis* im Weinberg, obwohl der Käfer sich auch in dieser Region seit 1988 ausgebreitet hat (Chapin & Brou 1991). Dieser Fragestellung wird in Kapitel 4.3 nachgegangen.

1.1.3.3 Konkurrent von einheimischen Arten

Brown et al. (2011) beschreibt einen Rückgang in den Populationsgrößen von europäischen einheimischen Marienkäferarten. Eine Reduktion innerhalb von drei Jahren (2006-2008) wurde für *Adialia bipunctata*, *Coccinella septempunctata* und *Propylea quatuordecimpunctata* festgestellt, währenddessen *H. axyridis* der häufigste Marienkäfer wurde (Brown et al. 2011). In Nordamerika wird ebenfalls eine Reduktion einheimischer Marienkäferarten wie *Brachiacantha ursina*, *Cycloneda munda* und *Chilocorus stigma* beschrieben (Brown & Miller 1998; Colunga-Garcia & Gage 1998). Des Weiteren wurde eine Reduktion des Monarchfalters, *Danaus plexippus*, durch *H. axyridis* bewiesen (Koch et al. 2003).

Gründe für die Reduktion einheimischer Arten sind in der Biologie des Käfers zu finden. Seine hohe Anpassungsfähigkeit an neue Habitate und vielfältige Nahrungsressourcen (Koch 2003), seine bessere Beutefindung (Pervez & Omkar 2006), längere Lebensdauer sowie mehr Generationen pro Jahr (Savoiskaya 1970; Klausnitzer & Klausnitzer 1997) und seine bessere Verteidigung gegen Pathogene und Prädatoren (Koyama & Majerus 2008; Roy et al. 2008; Gross et al. 2010; Roy et al. 2011) machen ihn konkurrenzstark. Aber auch das effiziente Fressen von Eiern und Larven anderer Arten (Yasuda et al. 2001; Snyder et al. 2004; Soares et al. 2004; Burgio et al. 2005) führten zu einer Dezimierung in der Population einheimischer Arten.

Inwieweit bereits auch in Deutschland einheimische Marienkäferarten durch das Auftreten von *H. axyridis* verdrängt werden, soll in dieser Studie geklärt werden.

1.1.3.4 Lästling in Wohngebieten

Bei der Suche nach Überwinterungsquartieren im Herbst sucht sich *H. axyridis* vornehmlich Häuser oder geschützte Bauten aus (Obata 1986; Sakurai et al. 1993; Nalepa et al. 1996; Riddick et al. 2000; Kovach 2004). Dabei kommt es des Öfteren zu Massenansammlungen auf Fensterbänken, an Häuserfassaden oder in Rolladenkästen (Kögel 2010). Dringen die Käfer in die Häuser ein, kann es bei Hausbewohnern zu Ekelgefühlen, aber auch zu leichten allergischen Reaktionen gegen die geruchsintensive Hämolymphe der Käfer kommen (Yarbrough et al. 1999; Magnan et al. 2002).

1.2 Untersuchungszeitraum und Untersuchungsgebiet

Alle empirischen Untersuchungen wurden im Zeitraum von September 2009 bis Januar 2012 durchgeführt. Für die Freilandversuche im Weinberg standen rund um das Julius Kühn - Institut (JKI) in Siebeldingen (Deutschland, Rheinland-Pfalz, N 49° 12'; E 008° 3') Weinberge unterschiedlicher Bewirtschaftung und unterschiedlicher Rebsorten-Bepflanzung zur Verfügung. Die Weinausbauversuche wurden ebenfalls am JKI in Siebeldingen in der Versuchskellerei durchgeführt. Auf dem Gelände des JKI in Dossenheim (Deutschland, Baden-Württemberg, N 49° 45'; E 008° 62') konnten Freilandversuche in Obstplantagen sowie in kleinen Parzellen mit Feldfrüchten durchgeführt werden. Die Laborversuche fanden am JKI für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau in Siebeldingen und Dossenheim sowie am JKI für ökologische Chemie, Pflanzenanalytik und Vorratsschutz in Quedlinburg (Deutschland, Sachsen-Anhalt) statt.

1.3 Zielsetzung/ Leitfragen der Arbeit

In der folgenden Dissertationsschrift sollen grundlegende Fragestellungen zu *H. axyridis* als potentiellem Schädling in deutschen Weinbaugebieten aufgegriffen und geklärt werden. Dabei ergaben sich vor dem Hintergrund des geschilderten wissenschaftlichen Kenntnisstandes und den sich am JKI bietenden Möglichkeiten folgende Leitfragen und Hypothesen, die in das Projekt „Grundlagen für ein Management des Asiatischen Marienkäfers im Obst- und Weinbau“ eingebunden waren.

1. Wie hoch ist die sensorische Schwelle des Marienkäfertons im Wein unter Berücksichtigung verschiedener Sorten und Verarbeitungskonstellationen? Wo befinden sich Ansätze zur Reduktion des Marienkäfertons im Wein bei Käferbefall im Lesegut?
2. Welche chemischen Substanzen (Methoxy-pyrazine) in der Hämolymphe von *H. axyridis* sind ausschlaggebend für den Marienkäfertons im Wein? Wie unterscheiden sich diese in ihrer Klasse und Höhe zu denen im einheimischen Siebenpunkt Marienkäfer *C. septempunctata*? Welche Rolle spielt Futter für die Methoxy-pyrazin-Gehalte im Käfer?
3. Welche speziellen biologischen und ökologischen Aspekte können für die Frage des Schadpotenzials der Art in Deutschland von Relevanz sein? Hierbei sind folgende Teilfragen von besonderer Bedeutung: Wie fügt sich die neue Art in das einheimische Artengefüge ein? Wo liegen die Aufenthaltsorte und in welchen Kulturen und Habitaten vermehrt sich *H. axyridis* am häufigsten? Inwieweit ist aufgrund der Habitatbedingungen für *H. axyridis* eine Abschätzung des Gefährdungspotentials für den deutschen Weinbau möglich? Wo stellt *H. axyridis* sogar ein Nützling im deutschen Weinbau dar?

2 Der „Marienkäfer“ als Fehlton im Wein

Teile dieses Kapitels wurden bereits in einer international erscheinenden Zeitschrift veröffentlicht:

Kögel, S., Gross, J., Hoffmann, C. (2012a): Sensory detection thresholds of 'ladybird taint' in 'Riesling' and 'Pinot noir' under different fermentation and processing conditions. Vitis. 51 (1), 27-32.

Die Publikation wird im Folgenden zusammenfassend erläutert und in den Kontext zu anderen Veröffentlichungen gesetzt:

Der Weinfehlton „Marienkäfer“ wurde erstmals im Jahre 2001 in den USA beschrieben, nachdem Massen von adulten *H. axyridis* in den Weinverarbeitungsprozess gelangten. Der Fehlton ruft Veränderungen des Weins im Aroma und Geschmack hervor. Bei Weiß- und Rotweinen (Riesling, Spätburgunder, Chasselat und Red Bergamais) wurden die Geschmacksrichtungen „grünes Gemüse“, „Spargel“, „Erdnuss“ und „Paprika“ intensiver wahrgenommen als für die Weinsorte typisch ist (Pickering et al. 2004; Pickering et al. 2005; Linder et al. 2009; Abbildung 2). Von Linder et al. (2009) wurde eine Reduktion der Fruchtigkeit, der Säure und der Struktur der Weine beschrieben. Des Weiteren wiesen die mit *H. axyridis* kontaminierten Weine eine intensivere Farbe auf (Linder et al. 2009). 2-Isopropyl-3-Methoxypyrazin (IPMP) wurde als die verantwortliche chemische Substanz, die den Fehlton im Wein hervorrufen kann, identifiziert (Pickering et al. 2007a). In anderen Studien wurde aber auch diskutiert, dass 2-secbutyl-3-Methoxypyrazin (SBMP) dafür verantwortlich ist (Galvan et al. 2008b; Ross et al. 2010). Beide Substanzen gehören den Methoxypyrazinen an, welche zum einen in der Hämolymphe der Insekten vorkommen (siehe Kapitel 3) und zum anderen in Trauben und somit Weinen auch natürlich vorkommen können. Vor allem die Weine aus Sauvignon blanc, Merlot, Cabernet franc oder Cabernet sauvignon weisen hohe Gehalte an Methoxypyrazinen von IPMP, SBMP und 2-Isobutyl-3-Methoxypyrazin (IBMP) auf (Allen et al. 1996; Sala et al. 2002; Sala

et al. 2005). Auch diese Weine zeichnen sich durch eine intensive „grüne Note“ aus (Allen et al. 1990; Allen et al. 1991; Lacey et al. 1991; Noble et al. 1995).

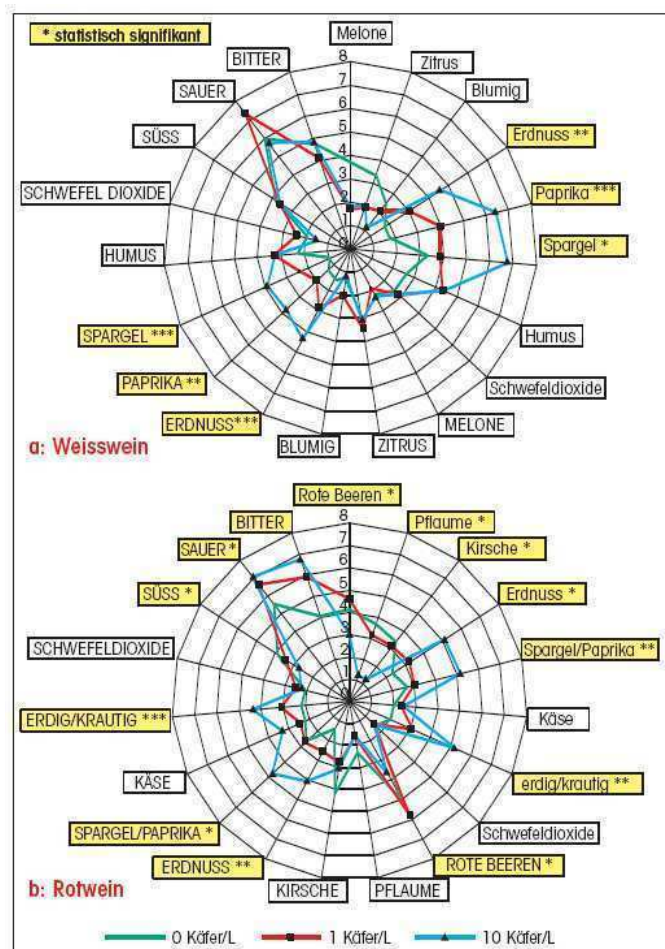


Abbildung 2: Ausprägung des Marienkäfertons bei 1 Käfer/ L und 10 Käfer/ L im Vergleich zu Wein ohne Käferbelastung (aus Riesen 2008).

In der Literatur wurde der Fehlton „Marienkäfertons“ erstmals mit dem Auftreten von *H. axyridis* in den Weinbergen und beim Weinverarbeitungsprozess beschrieben. Doch auch schon in den 70er und 80er Jahren wurde in Deutschland von einem ähnlichen Fehlton im Wein berichtet, nachdem der Siebenpunkt-Marienkäfer *C. septempunctata* während der Lese in Massen mit den Trauben verarbeitet wurde (Rapp¹, persönliches Gespräch).

¹ Professor Dr. Dr. Adolf Rapp; ehemaliger Leiter der Arbeitsgruppe Analytik des Julius Kühn-Instituts Siebeldingen und an der Universität Karlsruhe tätig, im Ruhestand

In den folgenden Versuchen wurde die sensorische Wahrnehmungsschwelle (Käfer von *H. axyridis*/ kg Trauben und ng IPMP/ L Wein) für die Rebsorten ‚Riesling‘ und ‚Spätburgunder‘ ermittelt. Bei der Sorte ‚Spätburgunder‘ wurden die beiden Fermentationstypen Maischegärung und Maischeerhitzung gewählt, um eine Beeinflussung dieser Arten der Maischebehandlung auf die sensorische Schwelle herauszufinden.

Weitere mögliche Lösungsansätze zur Reduktion des Marienkäfertons während des Weinbereitungsverfahrens wurden durch die Veränderung des Pressdruckes und der Pressdauer der Weinpressen ermittelt.

Die Versuche wurden in den Jahren 2010 und 2011 durchgeführt. Als Versuchstiere wurden während der Weinlesezeit und somit kurz vor den Versuchen adulte *H. axyridis* aus dem Freiland in den Weinbergen des JKI Siebeldingen per Hand gesammelt. Die Pressversuche wurden in der Versuchskellerei des JKI in Siebeldingen durchgeführt. Die Weinverkostung fand im Sensorikraum des oben genannten Instituts mit 10 trainierten Weinprüfern statt.

2.1 Sensorische Wahrnehmungsschwelle des Marienkäfertons

Zur Ermittlung der sensorischen Wahrnehmungsschwelle (Schwelle, bei der 50 % der Testpersonen einen Fehlton erkennen) von *H. axyridis*/ kg der weißen Traubensorte ‚Riesling‘ wurden je 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 und 20 Käfer/ kg Trauben lebend vor dem Pressvorgang zu den Trauben (5 kg Gesamttraubenmenge) hinzugegeben. Die Trauben wurden mit der definierten Käfermenge schließlich bei 5 bar gepresst, der Most nach standardisiertem Mikrovinifizierungsverfahren ausgebaut und 4 Monate später verkostet (siehe Kögel et al. (2012a)).

Jeweils 1, 2, 3, 4 und 10 Käfer/ kg Trauben wurden roten Trauben der Sorte ‚Spätburgunder‘ zugesetzt. Die geringere Variantenanzahl als bei ‚Riesling‘ war bedingt durch die höhere benötigte Gesamtausbaumenge an Trauben (15 kg). In geringerer Menge wäre in den vorhandenen Gärcontainergrößen keine Maischegärung möglich gewesen. Die sensorische Wahrnehmungsschwelle von *H. axyridis*/ kg der roten

Traubensorte ‚Spätburgunder‘ wurde in zwei verschiedene Varianten aufgeteilt. Bei der ersten Variante wurde die Maische bei 65 °C für 3 h erhitzt. Die zweite Variante wurde sechs Tage in Gärbehältern bei Kellertemperatur auf der Maische vergoren. Anschließend wurde die Maische bei 1,8 bar gepresst, ebenfalls nach standardisiertem Mikrovinifizierungsverfahren ausgebaut und vier Monate später verkostet (siehe Kögel et al. (2012a)).

Für die Versuche zur Ermittlung der sensorischen Wahrnehmungsschwelle in ng IPMP/ L Wein wurde synthetisches IPMP (Sigma Aldrich, Nr. 243132) in H₂O verdünnt und zum einen in den Konzentrationen 1, 2, 11, 50, 100 ng/ L in im Jahr 2008 abgefüllten Flaschen ‚Spätburgunder‘ zugesetzt. Zum anderen wurden die Konzentrationen 1, 3, 11, 50 und 100 ng/ L ebenfalls in im Jahr 2008 abgefüllten Flaschen ‚Riesling‘ künstlich zugesetzt. Die Weine wurden 1 h nach der künstlichen Kontamination verkostet.

2.1.1 Sensorische Wahrnehmungsschwelle des Marienkäfertons (Käfer/ kg) in der weißen Traubensorte ‚Riesling‘

Die sensorische Wahrnehmungsschwelle zeigte eine Abhängigkeit von dem Weinbereitungsverfahren und der Rebsorte. Die in 2009 und 2010 durchgeführten Versuche zeigten, dass 4-5 Käfer/ kg Trauben in der weißen Rebsorte ‚Riesling‘ von 50 % der Testpersonen wahrgenommen werden konnten (Abbildung 3a). Pickering et al. (2007a) ermittelten die sensorische Wahrnehmungsschwelle in Riesling bei 0,6 Käfern/ kg Trauben. Dieser geringere Wahrnehmungswert von Pickering et al. (2007a) im Vergleich zu den eigenen Ergebnissen ist offenbar auf unterschiedliche Versuchsansätze zurückzuführen. Bei Pickering et al. (2007a) wurde lediglich eine Variante unter natürlichen Bedingungen hergestellt und 3 lebende Käfer/ kg Lesegut zugegeben. Aus diesem Wein wurde schließlich eine Weinmischung aus belastetem Wein (3 Käfer/ kg) und unbelastetem Wein hergestellt. Daraus wurde mathematisch die Schwelle ermittelt. In der vorliegenden Studie wurden lebende Käfer in hoher Va-

riantenzahl den Trauben vor der Pressung hinzugegeben und aus diesen ausgebauten Weinen die sensorische Wahrnehmungsschwelle ermittelt.

2.1.2 Sensorische Wahrnehmungsschwelle des Marienkäfertons (Käfer/ kg) in der roten Traubensorte ‚Spätburgunder‘

In der roten Weinsorte ‚Spätburgunder‘ konnten je nach Fermentationsart der Trauben 3-6 Käfer/ kg Trauben von 50 % der Testpersonen erkannt werden (Abbildung 3b). Bei Maischegärung der Trauben lag die sensorische Wahrnehmungsschwelle bei 3 Käfern/ kg. Linder et al. (2009) errechneten für dieselbe Rebsorte und ebenfalls Maischegärung eine Schwelle von 5 Käfern/ kg. Galvan et al. (2007) beschrieben 5 Käfer/ kg in der roten Weinsorte ‚Frontenac‘ als sensorische Schwelle. Pickering et al. (2007a) ermittelten dagegen eine deutlich geringere Wahrnehmungsschwelle (erkannt von 75 % der Testpersonen) von 1,26 Käfern/ kg Spätburgundertrauben. Auch hier hat vermutlich der unterschiedliche Versuchsaufbau einen wesentlichen Einfluss auf die Differenzen der Wahrnehmungsschwelle gehabt. Pickering et al. (2007a) gaben lebende Käfer (10 Käfer/ L) einem Traubensaftkonzentrat der Sorte ‚Spätburgunder‘ zu. In dieser Studie und bei Galvan et al. (2007) wurden die Käfer, der Realität entsprechend, in unterschiedlicher Konzentration direkt den Trauben vor der Pressung zugegeben. Bei Pickering et al. (2007a) wurde schließlich das Traubensaftkonzentrat zu Wein ausgebaut. Dieser mit Käfern belastete Wein wurde mit unbelastetem Wein in verschiedenen Konzentrationen gemischt. Somit wurde die Schwelle für Käfer/ kg Trauben lediglich mathematisch errechnet, indem die Traubenmenge, die für das Traubensaftkonzentrat verwendet wurde, rückgerechnet wurde. Auch wird die Eintragsmenge an Hämolymphe der lebenden Käfer direkt in das Konzentrat und somit im Most höher sein als wenn die Käfer in einem Schritt vorher den Trauben zugesetzt werden und anschließend in der Presse die Hämolymphe, je nach Zerquetschung (siehe Kapitel 2.2), nur teilweise in den Most gelangt.

Die sensorische Wahrnehmungsschwelle erhöhte sich auf 6 Käfer/ kg bei maischegärten Spätburgundertrauben. Dieses Verfahren wurde in früheren Veröffentli-

chungen noch nicht zur Ermittlung von Grenzwerten des Marienkäfertons genutzt. Eine Erhöhung der Schwelle von 3 Käfer/ kg bei Maischegärung auf 6 Käfer/ kg bei Maischeerhitzung ist vermutlich durch mehrere Faktoren bedingt. Zum einen verbleiben die Käfer bei der Maischeerhitzung eine kürzere Verweildauer (3 h bei 60 °C statt 6 Tage bei Raumtemperatur) in der Maische. Da Pyrazine alkohollöslich sind, lösen sich vermutlich in der geringeren Zeit weniger Pyrazine in der Maische. Zum anderen verflüchtigen sich vermutlich Pyrazine bei der Erhitzung. Zwar liegt ihr Siedepunkt erst bei ca. 120°C, jedoch werden auch schon bei niedrigeren Temperaturen geruchsrelevante Mengen freigesetzt.

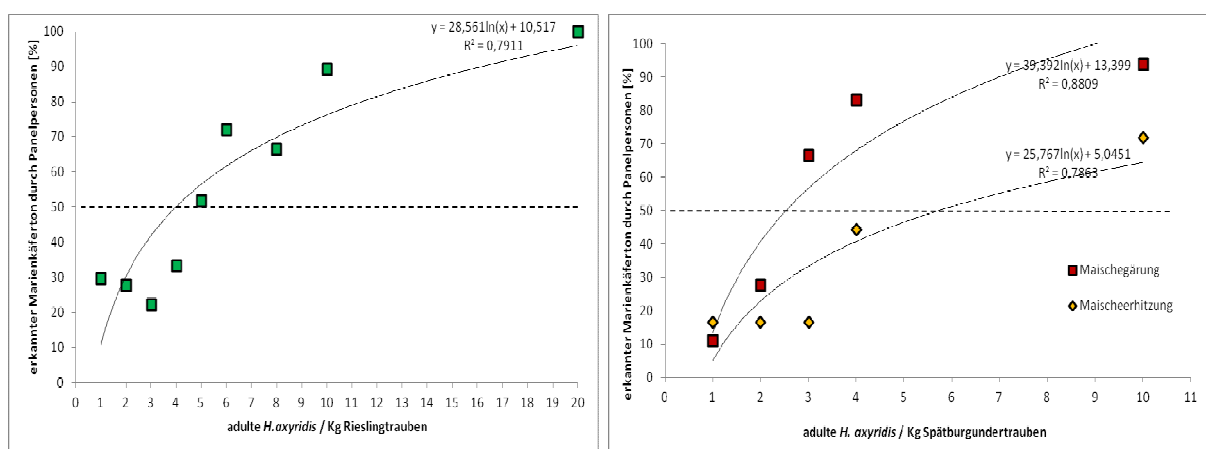


Abbildung 3 a+b: Sensorische Wahrnehmung des Marienkäfertons von den Panelpersonen [%] (n=10) bei unterschiedlichen Mengen an Käfer/ kg Rieslingtrauben (a) und Spätburgundertrauben (b). Beim Spätburgunder sind die unterschiedlichen Gärverfahren Maischegärung (rotes Quadrat) und Maischeerhitzung (orangene Raute) getrennt dargestellt. Der Schwellenwert, bei der 50 % der Panelpersonen den Ton erkannt haben, ist als Linie gekennzeichnet. Die logarithmische Trendlinie gibt den theoretischen Verlauf an.

Der Einfluss des Gärverfahrens ist vermutlich ebenfalls ein Grund, dass weiße Weine in der bisherigen Literatur stets höhere sensorische Wahrnehmungsschwellen aufwiesen als rote Weine (Galvan et al. 2007; Pickering et al. 2007a; Linder et al. 2009). Die weißen Trauben wurden in diesen Studien ebenfalls keiner Maischegärung unterzogen, wie es für Weißweine auch untypisch wäre, und die roten Trauben stets einer mehrtägigen Maischegärung statt Maischeerhitzung. Auch in den Versuchen der vorliegenden Studie wiesen die weißen Trauben ohne Maischegärung eine höhere sensorische Schwelle auf als die roten Trauben mit Maischegärung (4 Käfer/ kg

statt 3 Käfer/ kg). Somit liegt der Grund der unterschiedlichen Wahrnehmungsschwelle vermutlich nicht in der Weinsorte, sondern in den differierenden Weinbereitungsverfahren.

2.1.3 Sensorische Wahrnehmungsschwelle des Marienkäfertons (ng IPMP/ L) in ‚Riesling‘ und ‚Spätburgunder‘

Wird die sensorische Schwelle nicht als Käfer/ kg sondern ng IPMP/ L angegeben, so lag diese in ‚Riesling‘ bei 2 ng/ L und in ‚Spätburgunder‘ bei 1 ng/ L (Abbildung 4). Gehalte von 2 ng IPMP/ L wurden auch für einen roten Cuvéewein (Sala et al. 2004) und ‚Sauvignon blanc‘ (Allen et al. 1991) ermittelt. Für ‚Chardonnay‘ und ‚Gewürztraminer‘ ermittelten Pickering et al. (2007b) Werte der besten Wahrnehmung von 0,32 beziehungsweise 1,56 ng IPMP/ L. Bei Pickering et al. (2007b) wurden die Werte der Wahrnehmung nur orthonasal ermittelt. In der vorliegenden Studie wurden die Weine sowohl orthonasal als auch retronasal verkostet, was die Wahrnehmungsschwelle erniedrigt. In Wasser wurde IPMP mit 2 ng/ L wahrgenommen (Murray et al. 1970; Seifert et al. 1970; Sala et al. 2005). In Traubensaft wurden orthonasale Wahrnehmungswerte von 0,74 bis 1,11 ng/ L ermittelt (Pickering et al. 2008c). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Weinsorte und die Matrix, in der IPMP vorkommt, doch eine Rolle spielen. Dies würde die Ergebnisse des obigen Abschnittes nicht bestätigen. Insofern können auch weitere Bedingungen einen Einfluss haben, denn bei der Ermittlung sensorischer Wahrnehmungsschwellen sind natürlich vorkommende Methoxy-pyrazine in den Trauben ebenfalls von großer Bedeutung. In Riesling- und Spätburgundertrauben können je nach Reifegrad natürliche Gehalte von IPMP vorkommen. Unreife Trauben enthalten mehr IPMP als reife Trauben (Allen & Lacey 1993; Allen 1995). Somit können Trauben, die noch vor der endgültigen Reife gelesen werden, auch natürlicherweise Methoxy-pyrazine enthalten.

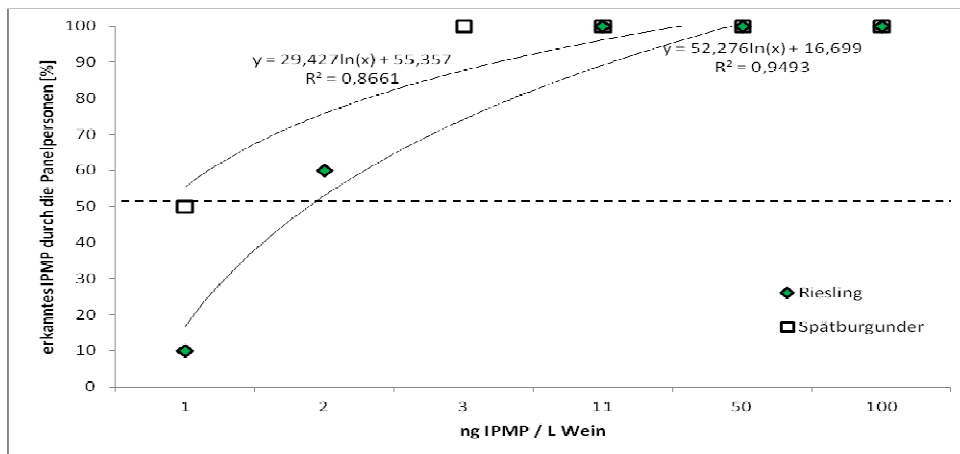


Abbildung 4: Sensorische Wahrnehmung des Marienkäfertons von den Panelpersonen [%] (n=10) bei unterschiedlichen Mengen an ng/ L Rieslingwein (Raute) und Spätburgunderwein (Viereck). Der Schwellenwert, bei der 50 % der Panelpersonen den Ton erkannt haben, ist als Linie gekennzeichnet. Die logarithmische Trendlinie gibt den theoretischen Verlauf an.

2.2 Lösungsansätze zur Verminderung des Marienkäfertons im Wein

Ein erster Lösungsansatz wurde bereits in Kapitel 2.1 genannt. Da sich die sensorische Wahrnehmungsschwelle bei maiseerhitzten Trauben auf 6 Käfer/ kg Trauben erhöhte (im Vergleich zu 3 Käfer/ kg bei maisevergorenen Trauben) ist es ratsam, bei Käferbefall in roten Sorten das Verfahren der Maiseerhitzung zu nutzen statt eine Maischegärung über mehrere Tage zu wählen.

Im Jahr 2010 wurden Versuche zur Ermittlung des Einflusses von Pressdruck und Pressdauer auf die Mortalität von adulten *H. axyridis* durchgeführt. Für den Pressdruck-Versuch wurden jeweils 9 lebende adulte *H. axyridis* in 3 Kg Rieslingtrauben (entspricht 3 Käfer/ kg) gegeben und bei definiertem Druck (je 1, 2, 3, 4 und 5 bar) gepresst. Jede Variante wurde 15 min gepresst und anschließend die Käfer aus der Maische per Hand ausgesammelt und auf Mortalität überprüft.

Für den Pressdauer-Versuch wurden 15 lebende adulte *H. axyridis* jeweils 15 kg Rieslingtrauben zugesetzt und für 90 min bei 2 bar gepresst. Nach 30, 60 und 90 min wurde die Presse gestoppt. Die Käfer wurden aus der Maische per Hand gesammelt

und auf Mortalität und Quetschungen geprüft. Alle Käfer, unabhängig ob tot oder lebend, wurden anschließend wieder in die Presse gegeben und der Pressvorgang fortgesetzt.

Durch die Versuche wurden der Pressdruck und die Pressdauer während des Pressverfahrens als mögliche Lösungen zur Verminderung des Marienkäfertons im Wein identifiziert. Hierbei spielt die Verringerung des Eintrags der Hämolymphe durch vollständige Zerquetschung von *H. axyridis* in den Most bei der Weinbereitung die bedeutendste Rolle. Denn alleine das Reflexbluten der Käfer reicht nicht aus, um den Marienkäferton hervorzurufen (Pickering et al. 2004; Galvan et al. 2007). Eine Pressung zwischen 1 und 2 bar, wie sie auch bereits in der weltweiten Weinbaupraxis verwendet wird, ließ im Mittel lediglich 50 % der Käfer zerquetschen. Alle Drücke über 2 bar erhöhten die Mortalität und somit die Zerquetschung der Käfer. Bei 5 bar lag die Mortalität bei 95 %. Somit sollten alte Schlauch- oder Spindelpressen, die mit Drücken über 2 bar arbeiten, bei Käferbefall nicht eingesetzt werden (Abbildung 5a).

Die praxisrelevante Pressdauer beträgt 90 min. Bei dieser Pressdauer wurde eine Mortalitätsrate von 92 % erreicht. Eine Pressdauer unter 45 Minuten bei 2 bar reduzierte die Mortalität der Käfer auf weniger als 50 % (Abbildung 5b).

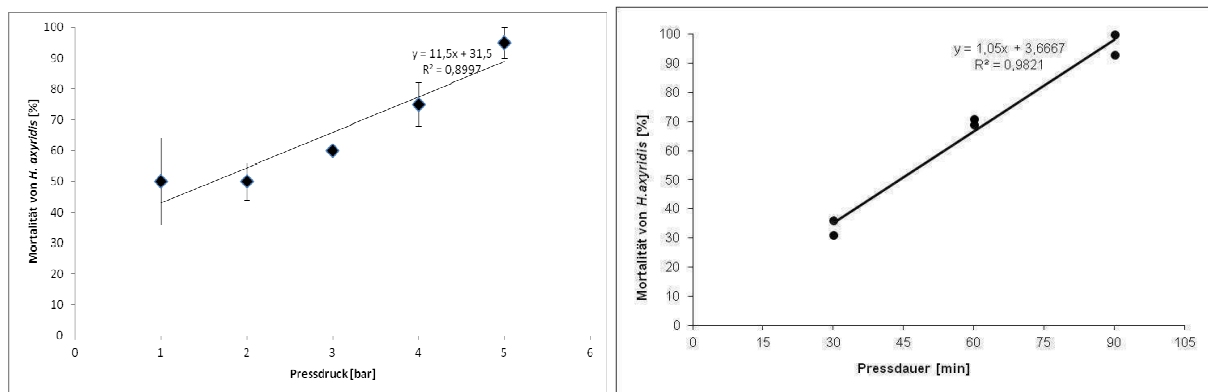


Abbildung 5 a+b: Der Einfluss von Pressdruck (a) [in bar] und Pressdauer (b) [in min] auf die Mortalität von *H. axyridis* [in %] in der Weinpresse. Eine lineare Trendlinie ist eingefügt.

Bei beiden Faktoren muss zwischen geringerer Mostausbeute durch geringeren Druck und kürzere Pressdauer und Reduktion des Marienkäfertons abgewogen werden. Bei einem Käferbefall oberhalb der sensorischen Wahrnehmungsschwelle von

3-6 Käfern/ kg Trauben, wie in Kapitel 2.1, genannt sollte jedoch die Weinqualität im Vordergrund stehen.

Weitere Lösungsansätze zur Verringerung des Marienkäfertons im Wein sind aus der Literatur bekannt. Synthetische Korkstopfen als Flaschenverschluss sind bei marienkäferbelasteten Weinen Naturkorken, Schraubverschlüssen und Glasverschlüssen vorzuziehen (Blake et al. 2009; Pickering et al. 2009; Pickering et al. 2010). Ebenso verringern TetraPak-Kartons anstelle von Glasflaschen als Weinverpackung den Marienkäferton (Blake et al. 2009; Pickering et al. 2009). Die Lagerungsdauer und -temperatur sowie die Flaschenfarbe hatten keinen Einfluss auf die Methoxypyrazin-gehalte im Wein (Pickering et al. 2005; Blake et al. 2010). Bereits während des Weinausbauprozesses können Hefen, Holzchips oder Aktivkohle zu einer Verbesserung der Weinqualität von käferbelasteten Weinen beitragen (Pickering et al. 2006; Pickering et al. 2008b).

Die aufgeführten Lösungsansätze setzen bei dem Pressvorgang an. Es ist jedoch wünschenswert, schon bereits den Einflug von *H. axyridis* in den Weinberg zu verhindern. Hierzu müssen jedoch vorher die Ökologie des Käfers innerhalb bestimmter Landschaftsstrukturen sowie Fangmethoden bekannt sein. Dazu wurden innerhalb dieser Dissertation (Kapitel 4) die Grundlagen erarbeitet.

3 Methoxypyrazine in der Hämolymphe von Coccinelliden

Insekten speichern giftige Wirkstoffe meist nicht in Drüsen, sondern in der Hämolymphe (Dettner 2010). In der Hämolymphe von Coccinelliden finden sich eine Reihe von Alkaloiden, die zur Abwehr gegen Fressfeinde eingesetzt werden. An Alkaloiden sind vor allem Methoxypyrazine enthalten, die zur chemischen Verteidigung dienen und als Warngerüche fungieren (Dettner 2010). Für *H. axyridis* werden drei Methoxypyrazine angegeben, die in der Hämolymphe vorkommen. Diese sind IPMP, IBMP und SBMP (Abbildung 6) (Cudjoe et al. 2005; Cai et al. 2007) und wurden ebenfalls als verantwortlich für den Marienkäferton im Wein identifiziert (siehe Kapitel 2). Cai et al. (2007) beschrieben zusätzlich noch 2,5-Dimethyl-3-Methoxypyrazine (DMMP) als viertes geruchsaktives Methoxypyrazin in der Hämolymphe. Cudjoe et al. (2005) detektierten einen 100fach höheren IPMP-Gehalt in *H. axyridis* als in *C. septempunctata*. Für *C. septempunctata* nannte Cudjoe et al. (2005) IPMP als einziges messbares Methoxypyrazin in der Hämolymphe, während SBMP und IBMP nicht detektiert wurden. IPMP wurde ebenfalls von Abassi et al. (2000) als Aggregationspheromon und Abwehrsubstanz in *C. septempunctata* beschrieben.



Abbildung 6: Die drei relevanten Methoxypyrazine in der Hämolymphe von *H. axyridis*: 2-Isopropyl-3-Methoxypyrazin (IPMP), 2-Secbutyl-3-Methoxypyrazin (SBMP) und 2-Isobutyl-3-Methoxypyrazin (IBMP).

Im Hinblick auf eine Verunreinigung des Weins mit Hämolymphe der Marienkäfer würde dies bedeuten, dass von einem adulten *H. axyridis* eine 100fach höhere Gefährdung ausgeht, den Wein zu verunreinigen, als von dem nativen *C. septempunctata*. Dieses Gefährdungspotential wurde im Rahmen der folgenden Versuche neu untersucht. Des Weiteren wurden die Diversität und Häufigkeit der einzelnen Methoxypyrazine in beiden Arten ermittelt. Um den Einfluss von Futter auf

Methoxyypyrazingehalte im Käfer festzustellen, wurden IPMP-Gehalte bei unterschiedlicher Fütterung unter Labor- und Freilandbedingungen gemessen. Die unterschiedlichen Morphotypen von *H. axyridis* (siehe Abbildung 1) wurden dabei ebenfalls getrennt betrachtet.

3.1 Etablierung einer Methode zur Messung von Methoxyypyrazingehalten in der Hämolymphe von Coccinelliden

Methoxyypyrazine sind leicht flüchtige Substanzen, die zur Stoffklasse der Alkaloide gehören. Die Gaschromatographie wird zur Detektion und Trennung von flüchtigen Stoffgemischen verwendet (Hesse 2005) und ist somit auch zum Analysieren von Pyrazinen geeignet. In der Literatur wurden bereits diverse Methoden zur Anreicherung und anschließenden gaschromatographischen Trennung von Pyrazinen beschrieben (Hashizume & Umeda 1996; Sala et al. 2002; Baker et al. 2003; Prouteau et al. 2004; Sala et al. 2005; Barra et al. 2007; Galvan et al. 2008b; Kotseridis et al. 2008; Pickering et al. 2008a; Schmarr et al. 2010). Neben der Flüssigextraktion und der Festphasenextraktion (SPE) wurde auch eine Probenvorbereitung mittels Dampf-raum-Festphasenmikroextraktion (HS-SPME) in einigen dieser Publikationen getestet. SPME bietet den Vorteil, aus Flüssigproben definierte leicht flüchtige Substanzen an eine Oberfläche mit einem geeigneten Adsorbens (Faser) anzulagern. Dabei werden die Analyten mittels SPME jedoch nicht vollständig aus der Wasserprobe extrahiert. Es stellt sich vielmehr ein Verteilungsgleichgewicht zwischen den im Gasraum gelösten und an der stationären Faser adsorbierten Analytmolekülen ein (HS). Dies garantiert eine maximale Ausbeute an Zielsubstanzen und eine Verdrängung unerwünschter Substanzen.

Je nach Polarität der Zielsubstanz stehen verschiedene Fasern zur Verfügung. Galvan et al. (2008b) testete zwei Fasertypen auf ihre Effizienz der Pyrazinextraktion, darunter auch eine Faser mit der Beschichtung Divinylbenzene/Carboxen/ Polydimethylsiloxane (Sigma Aldrich; DVB/Carboxen/PDMS - Faser, Produkt-Nr.: 57328-U). In der vorliegenden Studie wurde dieser Fasertyp für die Analysen gewählt. Die Faser

zeigte zwar eine hohe Empfindlichkeit bei kleinsten Veränderungen der Methoden-aufbereitung, bietet aber gleichzeitig eine effiziente Anlagerung von IPMP, SBMP und IBMP bei einer vergleichsweise kurzen Extraktionszeit von 30 min (Galvan et al. 2008b). Die exakte und standardisierte Probenvorbereitung ist die somit wichtigste Bedingung für HS-SPME-Analysen, um quantitative Aussagen treffen zu können.

Die folgende Methode ist eine Mischung bereits vorhandener Pyrazinanalytikmethoden, die jedoch auf eine schnelle (< 60 min) und einfache Probenvorbereitung und GC-Analyse modifiziert wurde. Je ein Käfer wurde stets in 10 mL H₂O bidest mit einem Mörser zerkleinert. Die Lösung wurde in 20 mL- Probengefäße gegeben und mit einer Schraubkappe mit Septum (Silikon-Polytetrafluorethylen-Mischung) verschlossen. Zu der 10 mL Wasser-Käfer-Lösung wurde vor der Analyse 3 g/10 mL NaCl sowie ein interner Standard der Konzentration 1 ng/10 mL zugegeben. Als interner Standard diente 3-Isopropyl-2-Ethoxypyrazin (IPEP). Ein interner Standard ist ein Hilfsmittel bei quantitativen Analysen zur Erkennung von Fehlern während des Analyseverfahrens. Er dient als relative Bezugsgröße, der den Einfluss des Verfahrens auf das Ergebnis abbilden und eine Einschätzung der Qualität des Verfahrens erlauben soll.

Da die Beladung der Faser nur über die Dampfphase erfolgte, wurden die Proben 20 min im Wasserbad bei 40 °C vorgewärmt und dabei mit einem Magnetrührfisch gerührt. Dies garantierte eine optimale Gleichgewichtsherstellung der Substanzen zwischen der Flüssig- und Gasphase bei gleicher Salzsättigung der Flüssigkeit. Zur Adsorption der Zielsubstanzen wurde die Faser im Dampfraum der Probe für 30 Minuten, ebenfalls bei 40 °C und bei gleichmäßigem Rühren, beladen. Zur anschließenden Analyse wurde die Probe mit dem GC-Massenspektrometer (GC-MS) untersucht. Die Injektionszeit, bei der die angereicherte Faser im Einlass des GC bei 270 °C desorbiert wurde, betrug 2 min. Für weitere 3 min wurde die Faser anschließend bei einem Durchfluss von 10 mL/min zur Reinigung im Einlass belassen. Das Ofenprogramm des GC wurde folgendermaßen programmiert: 45 °C für 5 min; dann Erhöhung der Temperatur mit 15 °C/min bis 100 °C; dann mit 3 °C/min bis 160 °C; mit 25 °C/min bis 200 °C; 200 °C für 5 min halten. Als Säule wurde eine DB-Wax (30 m

Länge, 0,25 mm Durchmesser, 0,5 µm Filmdicke, von J&W Scientific, Santa Clara, CA, USA) eingesetzt. Das Trägergas war Helium.

Zur Erhöhung der Sensitivität des MS für die gesuchten Zielsubstanzen wurde der SIM-Modus des MS verwendet. Dabei werden definierte Massenzahlen, die charakteristisch für die Substanzen sind, ausgewertet. An Massenzahlen wurde für 2-Isopropyl-3-Methoxypyrazin (IPMP) 137 und 152 verwendet. 2-Isobutyl-3-Methoxypyrazin (IBMP) dagegen mit 124 und 151 und 2-Secbutyl-3-Methoxypyrazin mit 124 und 137. Für den internen Standard wurden die Massenzahlen 137 und 151 gewählt. Mittels dieser Probenvorbereitung und GC-MS-Analyse ist eine klare Trennung der Methoxypyrazine möglich und die Chromatogramme bilden eindeutige Peaks ab (Abbildung 7).

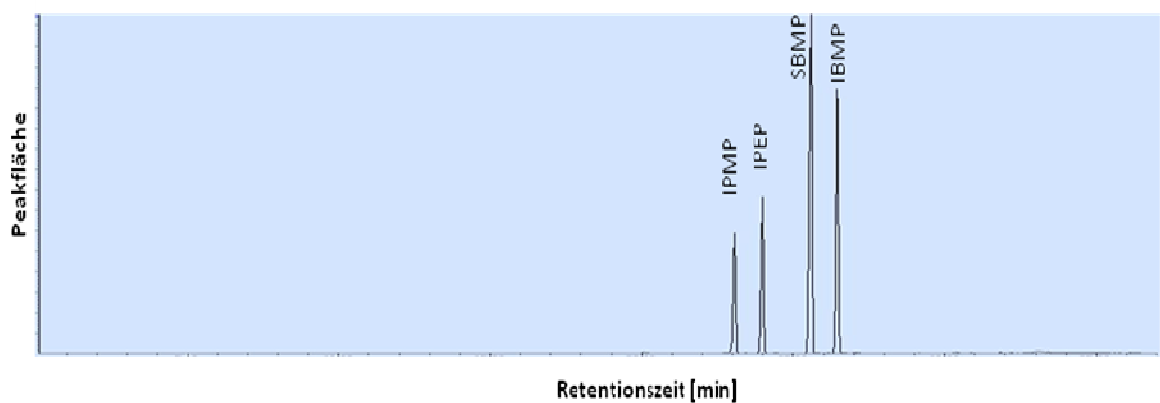


Abbildung 7: Chromatogramm einer H₂O-Lösung gemischt mit den Reinsubstanzen IPMP, IPEP, SBMP und IBMP. Die Probenvorbereitung fand mittels hs-SPME statt und die Trennung mit einem GC-MS.

Die Auswertung der erhaltenen Chromatogramme erfolgte mit dem Programm ChemStation D.03.00.611 von Agilent Technologies. Zur Qualifizierung der Datenpeaks dienten die Datenbank NIST und die Referenzsubstanzen IPMP, SBMP und IBMP (SIGMA Aldrich Nr. 297666, Nr. 243132 and Nr. 243116). Zur Quantifizierung der Datenpeaks wurde der Peak ins Verhältnis zum internen Standard gesetzt. Dazu wurde vorher jeweils eine Kalibrierungsgerade für IPMP, SBMP, IBMP und den internen Standard IPEP ermittelt.

3.2 Geruchsrelevante Methoxypyrazine in der Hämolymphe von *H. axyridis* und *C. septempunctata*

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden in einem internationalen Journal publiziert (siehe Anhang):

Kögel, S., Hoffmann, C., Gross, J., Ulrich, D. (2012b): Diversity and frequencies of methoxypyrazines in hemolymph of Harmonia axyridis and Coccinella septempunctata and their influence on the taste of wine. European Food Research and Technology. 234: 399–404

Die Arbeit wird im Folgenden zusammengefasst.

Zur Klärung der Fragestellung, inwieweit *H. axyridis* aufgrund seiner höheren IPMP-Gehalte in der Hämolymphe als *C. septempunctata* (Cudjoe et al. 2005) ein höheres Gefährdungspotential hat, den Wein zu verunreinigen, wurde eine Weinprobe durchgeführt. Die für die Weinbereitung verwendeten Insekten stammten aus einer Laborzucht des JKI Dossenheim. Die Käfer wurden unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer (wechselnde Temperaturen während einer Woche (168 h): 100 h bei 25 °C, 68 h bei 20 °C; 16:8 h L/D, 60% LF) und definiertem Futter (Erbsenblattlaus *Acyrtosiphon pisum*) gezüchtet. Jeweils 8 bzw. 16 adulte Käfer von *H. axyridis* und *C. septempunctata* wurden in je 10 mL H₂O gemörsert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde Wein der Sorte Riesling (1 L) aus 2009 zugegeben und der Ansatz in je 0,5 L-Flaschen abgefüllt und verschlossen. Als Kontrollwein diente Riesling aus dem Jahr 2009 ohne jegliche Käferbelastung. Auf Marienkäfertron im Wein trainierte Prüfer (n=10) bekamen die drei Varianten (*H. axyridis*-Wein, *C. septempunctata*-Wein und Kontrollwein) parallel zur Verkostung. Jede Person musste die drei Varianten nach der Intensität des Marienkäfertrons einordnen: 0 = kein Marienkäfertron erkennbar; 1 = geringster Gehalt an Marienkäfertron; 2 = mittlerer Gehalt an Marienkäfertron; 3 = am stärksten mit Marienkäfertron belastet. Die Verkostung wurde zweifach wiederholt.

Die sensorische Weinprobe zeigte eine signifikant höhere Rangsumme der maximalen Intensität des Marienkäfertons bei den Weinen, die mit *C. septempunctata*-Hämolymphe versetzt waren (80 % maximale Intensitätsrate), als bei den Weinen mit *H. axyridis* (50 % maximale Intensitätsrate). Die Variante 16 Käfer/ L wurde dabei stärker wahrgenommen als die Variante mit 8 Käfer/ L (Abbildung 8). In beiden Fällen bestanden signifikante Unterschiede in der Wahrnehmung des Marienkäfertons zwischen *C. septempunctata*-Wein und *H. axyridis*-Wein (T-Test nach Student; $p < 0,05$).

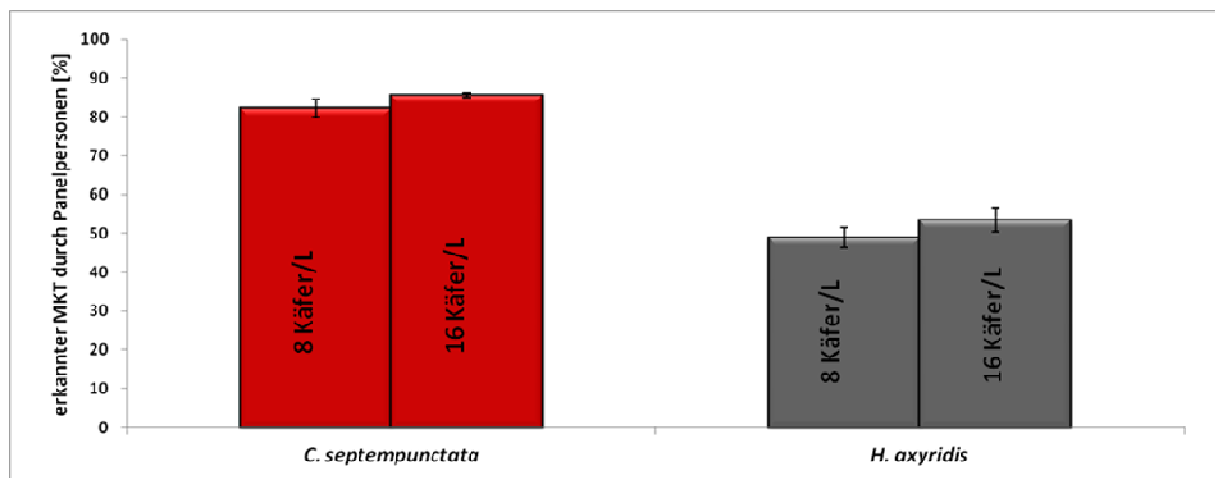


Abbildung 8: Rangsumme (in % der maximalen Intensität an MKT (Marienkäfertön) im Vergleich zur Kontrolle) von Weinen belastet mit *H. axyridis* bzw. *C. septempunctata* (8 bzw. 16 Käfer/ L) ermittelt durch eine Weinprobe mit 10 Panelpersonen. Die Standardabweichung ist angegeben.

Das Ergebnis der Weinprobe entsprach nicht den auf Cudjoe et al. (2005) basierenden Erwartungen. Bei einem 100fach höheren Gehalt an IPMP, wie ihn Cudjoe et al. (2005) beschrieb, hätte der mit *H. axyridis* versetzte Wein höhere Rangsummen erhalten müssen als *C. septempunctata*-Weine. Unsere Versuche zeigten jedoch das gegenteilige Ergebnis. Zur Klärung und besseren Deutung des Weinprobenergebnisses wurden im Anschluss gaschromatographische Analysen (GC; Agilent 6890) von Käfern durchgeführt. Diese sollten Klarheit über die Inhaltsstoffe in der Hämolymphe der beiden Arten und deren Geruchsaktivität bringen. Auch bei diesen Versuchen waren alle untersuchten Käfer Zuchtkäfer, die unter kontrollierten Bedingungen am JKI in Dossenheim gezüchtet wurden (siehe oben). Die gaschromatographische Analyse wurde mittels GC-Massenspektroskopie (MS; Agilent 5870B), GC-Stickstoff-

Phosphor-Detektor (NPD; Agilent 6890) und GC-Olfaktometrie (O; Gerstel ODP3) durchgeführt. Die genauen Analysenparameter sind in Kapitel 3.1 sowie bei Kögel et al. (2012b) angegeben.

Die Analysen der drei häufigsten Methoxy-pyrazine IPMP, IBMP und SBMP von jeweils 50 Käfern einer Art mit dem GC-MS zeigten folgendes Bild: IPMP konnte in beiden Arten und in jedem Käfer detektiert werden (100 %). SBMP wurde in 36 % aller Käfer von *C. septempunctata* gefunden und IBMP in 60 % der Käfer. Bei *H. axyridis* zeigte sich ein konträres Ergebnis: SBMP wurde in 87 % aller Käfer detektiert und IBMP in 32 % aller Käfer (Abbildung 9). Diese Ergebnisse bestätigten ein erhöhtes und dominantes Vorkommen von IPMP in der Hämolymphe beider Käferarten.

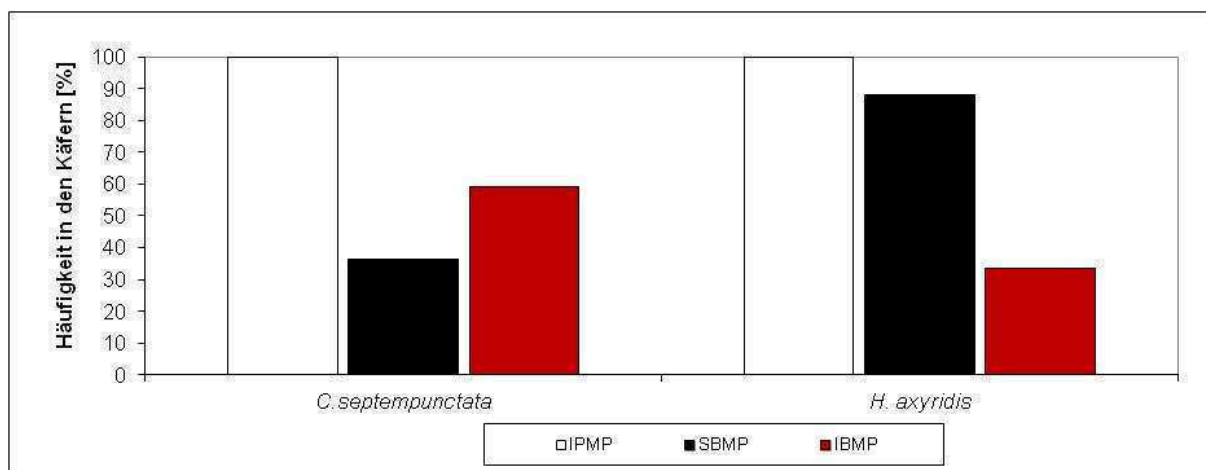


Abbildung 9: Häufigkeit [%] der Methoxy-pyrazine IPMP, SBMP und IBMP in der Hämolymphe von *C. septempunctata* und *H. axyridis* (jeweils n=50).

Um den Einfluss der drei detektierten Methoxy-pyrazine auf den Wein beurteilen zu können, musste deren Geruchsaktivität geklärt werden. Die Geruchsaktivität der einzelnen Hämolymphe-substanzen beider Arten wurde mit dem GC-Olfaktometer (GC-O) ermittelt. Als Sensorikpanel wurden sieben Personen (6 Frauen und 1 Mann) im Alter von 25 bis 52 Jahren ausgewählt und geschult.

In beiden Arten wurden sechs geruchsaktive Substanzen erkannt, die bezüglich ihrer Geruchsbeschreibung im Zusammenhang mit dem Marienkäfer-ton im Wein standen („grün“, „Spargel“, „muffig“, „Kartoffel“, „Keller“, „herb“, siehe Kapitel 2). IPMP wurde

in beiden Arten von allen Testpersonen mit der höchsten Geruchsintensität wahrgenommen. In *C. septempunctata* wurde zusätzlich IBMP von 100 % der Testpersonen wahrgenommen, in *H. axyridis* beschrieben lediglich 29 % den Geruch von IBMP (Abbildung 10). Von 71 % der Testpersonen wurde eine weitere Substanz in *C. septempunctata* mit „grün“ und „muffig“ beschrieben. Diese Substanz konnte jedoch nicht mit Hilfe von Datenbanken identifiziert werden.

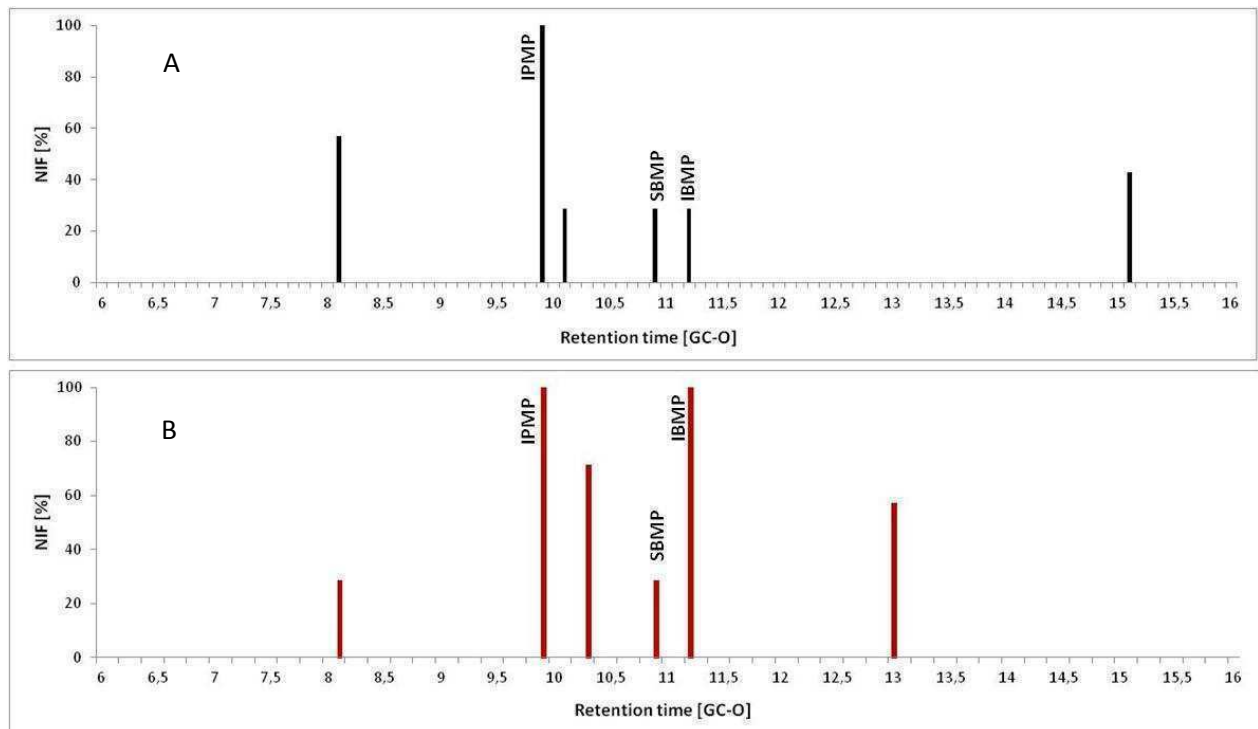


Abbildung 10: Häufigkeit der erkannten geruchsaktiven Substanzen (NIF = Nasal Impact Frequency) [%] in der Hämolymphe von *H. axyridis* (A) und *C. septempunctata* (B) mit Marienkäfer-ton-ähnlicher Beschreibung bei definierten Retentionszeiten im GC-O. Die drei Methoxyypyrazine IPMP, SBMP und IBMP sind gekennzeichnet.

Parallele GC-MS und GC-NPD-Analysen der gleichen Extrakte zeigten den höchsten Peak bei IPMP (Retentionszeit: GC-NPD: 18,8 min; GC-O: 9,98; Abbildung 11). In *C. septempunctata* konnten weiterhin SBMP und IBMP detektiert werden. Im Chromatogramm von *H. axyridis* fehlte ein messbarer IBMP-Peak, was die GC-O-Ergebnisse bestätigte. Jedoch wurde bei *H. axyridis* SBMP mit zweitgrößter Peakfläche hinter IPMP analysiert.

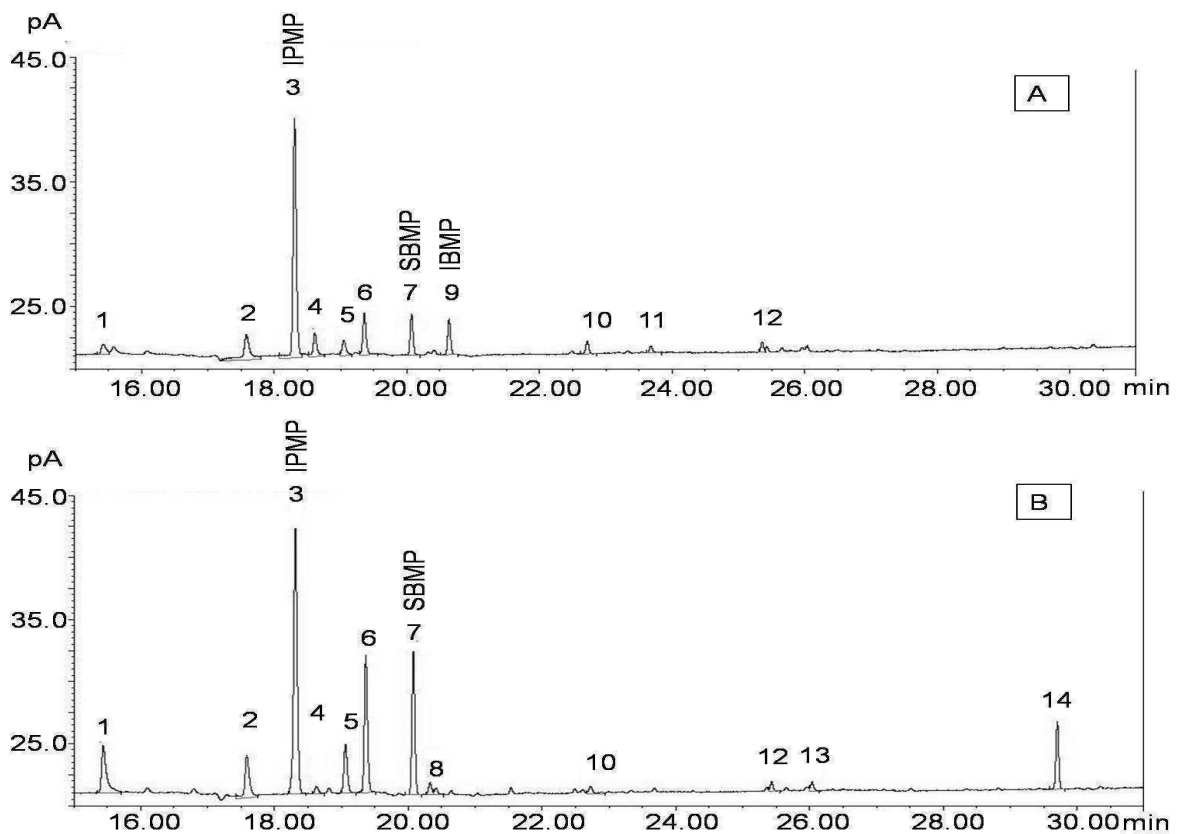


Abbildung 11: Chromatogramm der Hämolymphe von *C. septempunctata* (A) und *H. axyridis* (B) mit GC-NPD. Alle Peaks bei definierter Retentionszeit [min] mit einer Fläche > 10.000 pA sind nummeriert. Die Peaks der Methoxypyrazine IPMP, SBMP und IBMP sind beschriftet. (aus Kögel et al. 2012b)

Die Vermutung, dass nicht IPMP, sondern SBMP die prägende Substanz des Marienkäferferons ist (Galvan et al. 2008b; Ross et al. 2010), konnte durch die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden. IPMP wurde in den GC-O-Analysen orthonasal am stärksten wahrgenommen und hatte die größte Peakfläche in GC-MS und GC-NPD-Analysen. Des Weiteren wurde IPMP in 100 % aller untersuchten Käfer mittels GC-MS detektiert. SBMP konnte in *H. axyridis* zwar detektiert werden, jedoch war die sensorische Wahrnehmungsschwelle dieser Substanz zu gering für die Prüfer. Ein Einfluss der Ergebnisse durch die Hämolymphe-Matrix ist nicht auszuschließen, denn in anderen Matrices wie Wasser kann SBMP durchaus in geringen Mengen von 2 ng/L geruchlich wahrgenommen werden (Sala et al. 2002).

Diese Ergebnisse der Weinprobe und das Vorhandensein von IPMP, IBMP und SBMP in der Hämolymphe von *H. axyridis* bestätigten jedoch, wie bereits in früheren

Studien beschrieben, dass *H. axyridis* den Weingeschmack hinsichtlich des Marienkäfertons verändern kann (Pickering et al. 2004; Cai et al. 2007; Galvan et al. 2008b; Linder et al. 2009; Kögel et al. 2012a). Eine stärkere Beeinflussung des Weines hinsichtlich des Fehltons Marienkäfertons durch *C. septempunctata* war bisher nicht bekannt. In den 70er und 80er Jahren wurde zwar nach Einflug von *C. septempunctata* in den Weinberg eine Beeinflussung des Weingeschmacks vermutet (Rapp, persönliches Gespräch), jedoch existieren keine schriftlichen Berichte zu dieser Beobachtung. Bei einer Belastung mit *C. septempunctata* ist der Wein nicht nur sehr stark mit IPMP belastet, sondern auch mit IBMP, welches eine hohe Geruchsaktivität im GC-O zeigte. In *H. axyridis* wurde die zweite sehr geruchsaktive Substanz IBMP nur in sehr geringer Menge gerochen und befand sich im GC-NPD unter der Detektionsgrenze. Die bisherige Aussage nach Cudjoe et al. (2005), dass ein adulter *H. axyridis* durch seine IPMP-Gehalte in der Hämolymphe den Weingeschmack um den Faktor 100 stärker verdirbt als *C. septempunctata* konnte durch die Weinprobe sowie GC-O und GC-NPD-Ergebnisse widerlegt werden. Auch eine neue Studie von Botezatu and Pickering (2010) zeigte, dass sowohl mit *C. septempunctata* als auch mit *H. axyridis* belastete Weine ähnliche IPMP-Gehalte im Wein aufwiesen. Cudjoe et al. (2005) analysierte bei seinen Versuchen gefrorene Käfer. In der vorliegenden Studie und bei Botezatu and Pickering (2010) wurden stets frische Käfer für die Versuche verwendet. Darin liegt vermutlich ein entscheidender Unterschied. Jedoch können Pyrazingehalte in Käfern auch nahrungsabhängig sein (Kögel et al. (2012c), siehe Kapitel 3.3). Regionale sowie saisonale Unterschiede der Pyrazingehalte im Käfer können ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Weitere Forschung dazu ist unerlässlich.

3.3 Der Einfluss von Futter auf die IPMP-Gehalte in der Hämolymphe von *H. axyridis* und *C. septempunctata*

Diese Arbeit wurde in einem internationalen Journal veröffentlicht (siehe Anhang). Teile dieser Arbeit werden im Folgenden zusammenfassend erläutert.

Kögel, S., Eben, A., Hoffmann, C., Gross, J. (2012c): The influence of diet on fecundity, immune defense and 2-isopropyl-3-methoxy pyrazine content of Harmonia axyridis Pallas. Journal of Chemical Ecology. 38: 854–864

Wie in Kap. 3.2 beschrieben, konnten keine Unterschiede in der Häufigkeit des Vorkommens, in der Peakfläche und in der Geruchsintensität von IPMP zwischen den beiden Arten *H. axyridis* und *C. septempunctata* festgestellt werden (Kögel et al. 2012b). Zur Klärung, inwieweit jedoch Futter bei der Ausprägung von Methoxy pyrazinen in beiden Marienkäferarten eine Rolle spielen könnte, wurden weitere Versuche durchgeführt. Auch wurden damit exakte Werte von IPMP-Gehalten pro Käfer ermittelt. In der Literatur sind zwei Publikationen zu IPMP-Gehalten in *H. axyridis* erschienen. Cai et al. (2007) gaben Gehalte zwischen 1,2 und 29,4 ng/ g adulter *H. axyridis* mit oranger Elytrenfarbe (orange Käfer mit Punkten) an. Im Mittel waren dies 8,1 ng/ g adulter *H. axyridis*. Für Käfer mit gelber Elytrenfarbe (orange Käfer ohne Punkte) wurden Gehalte zwischen 0,35 ng/ g und 0,47 ng/ g Käfer gemessen. Im Mittel waren dies 0,41 ng/ g für *H. axyridis* mit gelber Elytrenfarbe. Cudjoe et al. (2005) nannte IPMP-Gehalte von 810 000 ng/ g Käfer für *H. axyridis* und 8 000 ng/ g Käfer für *C. septempunctata*.

In den eigenen Laborversuchen wurde ebenfalls die unterschiedliche Elytrenfarbe von *H. axyridis* bei den Gehaltsmessungen berücksichtigt und die Käfer nach orange ohne Punkte, orange mit vielen Punkten (beides Morphotyp *H. axyridis succinea*) und schwarz mit vier Punkten (Morphotyp *H. axyridis spectabilis*) unterteilt (siehe Abbildung 1). Die für die Laborversuche eingesetzten Marienkäfer waren Zuchttiere, die unter konstanten Bedingungen in der Klimakammer am JKI Dossenheim gezüchtet

wurden. Dabei wurden die Tiere unter drei verschiedenen Fütterungsvarianten gezüchtet. Gruppe 1 bekam als Nahrung die Erbsenblattlaus, *Acyrtosiphon pisum*, die auf Bohnen gezüchtet wurde, Gruppe 2 bekam ebenfalls Erbsenblattläuse und zusätzlich wurde den Käfern noch Traubensaft angeboten. Gruppe 3 wurde lediglich mit Eiern der Mehlmotte *Ephestia kuehniella* gefüttert. Zusätzlich standen allen Gruppen Wasser und Pollen zur Verfügung.

Im September 2011 wurden im Freiland jeweils 50 Tiere von *H. axyridis* und *C. septempunctata* an Trauben in einem Weinberg des JKI Siebeldingen abgesammelt und anschließend im Labor auf ihre IPMP-Gehalte untersucht.

Des Weiteren wurden rund um das JKI Siebeldingen und das JKI Dossenheim im April 2011 Puppen von *H. axyridis* auf *Prunus persica*, *P. cerasus*, *P. spinosa*, *P. domestica*, *P. mahaleb*, *Malus domestica*, *Acer platanoides*, *Hedera helix*, *Sambucus nigra* und *Corylus avellana* gesammelt. Dabei konnte davon ausgegangen werden, dass die Tiere während ihrer Larvalentwicklung eine definierte Futterquelle zur Verfügung hatten. Als Läuse auf den Wirtspflanzen wurde *Myzus varians* auf *P. persica*, *Brachycaudus helichrysi* auf *P. domestica*, *Dysaphis plantaginea* auf *M. domestica*, *Drepanosiphon platanoides* auf *A. platanoides*, *Aphis hederae* auf *H. helix*, und *A. sambuci* auf *S. nigra* identifiziert. Die Läuse auf den restlichen Pflanzen konnten nicht bestimmt werden. Die adulten Tiere wurden nach Schlupf nicht gefüttert und nach 3 Tagen auf ihre IPMP-Gehalte analysiert. Ob die Fütterung als adultes Tier eine zusätzliche Rolle spielt, wurde getestet, indem eine Gruppe für 5 Tage nach dem Schlupf mit dem selben Futter gefüttert wurde wie zur Larvalentwicklung.

Es konnte ein Zusammenhang zwischen der Elytrenfarbe und den IPMP-Gehalten im Käfer nachgewiesen werden. *H. axyridis spectabilis* hatte in einer Fütterungsvariante signifikant geringere Gehalte als *H. axyridis succinea* mit Punkten. *H. axyridis succinea* ohne Punkte hatte in zwei von drei Fütterungsvarianten signifikant geringere IPMP-Gehalte (Least Significance Difference (LSD); $p < 0,05$; Abbildung 12). Dieses Ergebnis bestätigte die Daten von Cai et al. (2007). Die IPMP-Gehalte von *H. axyridis succinea* mit Punkten lagen je nach Futter zwischen 4,2 ng IPMP/ g Käfer und 12 ng IPMP/ g Käfer. Im Mittel bedeutete das 8,1 ng IPMP/ g Käfer. Dies entspricht

exakt demselben Wert wie Cai et al. (2007) für die Käfer mit oranger Elytrenfarbe, also ebenfalls *H. axyridis succinea* mit Punkten, beschrieben haben. *H. axyridis* mit oranger Elytrenfarbe ohne Punkte wies je nach Futter mittlere IPMP-Gehalte zwischen 2,8 und 3,8 ng/ g Käfer auf, *H. axyridis spectabilis* Mittelwerte zwischen 2,5 und 5,1 ng/ g Käfer.

Zwischen *H. axyridis succinea* mit Punkten und *C. septempunctata* konnten signifikante Unterschiede in den IPMP-Gehalten festgestellt werden (LSD; $p < 0,05$; Abbildung 12). Lagen die Werte von *H. axyridis* bei Fütterung mit *A. pisum* um ein dreifaches höher, so waren sie bei einer Fütterung mit *A. pisum* und Traubensaft im Mittel um das 2-fache niedriger (LSD; $p < 0,05$). Bei den im Freiland auf Trauben gefangenen Tieren konnten keine Unterschiede in den IPMP-Gehalten zwischen *H. axyridis* und *C. septempunctata* gemessen werden (Mann-Whitney-U-test; $p > 0,05$).

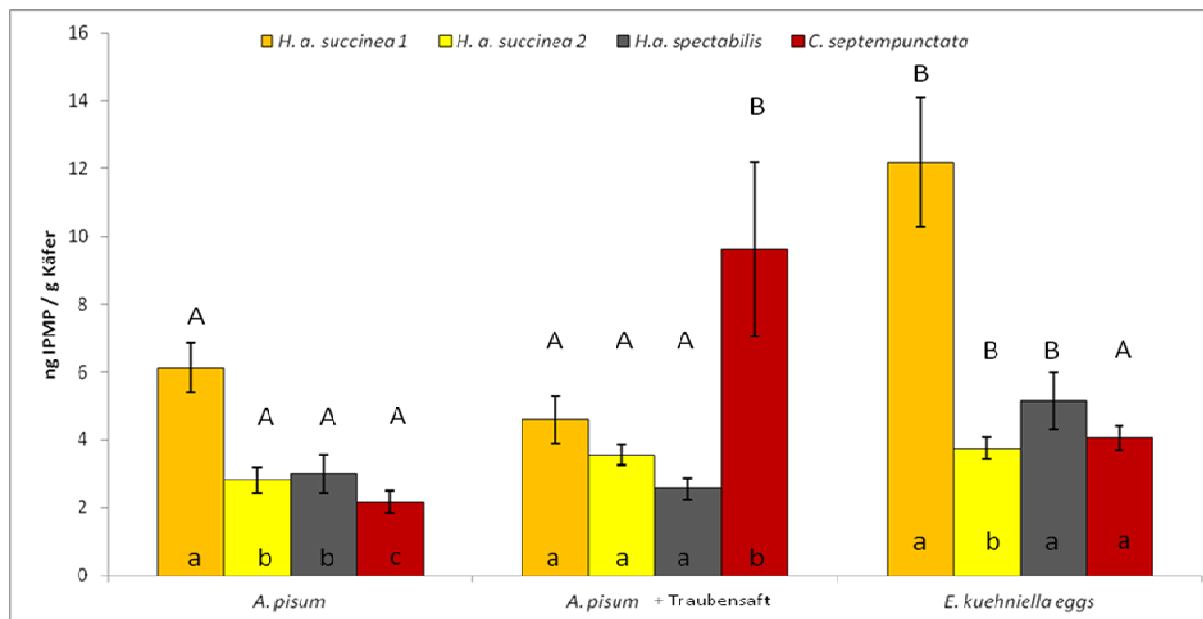


Abbildung 12: IPMP-Gehalte von *H. axyridis* (unterteilt in die Morphotypen *H.a. succinea* mit Punkten, *H.a. succinea* ohne Punkte und *H.a. spectabilis*) und *C. septempunctata* bei drei verschiedenen Fütterungsvarianten (*A. pisum*, *A. pisum* + Traubensaft und *E. kuehniella*-Eier). Die Großbuchstaben geben signifikante Unterschiede einer Art zwischen den Fütterungsvarianten an. Die Kleinbuchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Arten bzw. Morphotypen innerhalb einer Fütterungsvariante ($p < 0,05$).

Die Nahrung hatte somit einen Einfluss auf die IPMP-Gehalte der beiden Arten. Signifikante Unterschiede konnten für alle Elytrenfarben von *H. axyridis* zwischen den Varianten *A. pisum* und *E. kuehniella* gemessen werden (LSD; $p < 0,05$). Bei *C. septempunctata* hatten die mit *A. pisum* und Traubensaft gefütterten Tiere signifikant höhere IPMP-Gehalte als die beiden anderen Fütterungsgruppen (LSD; $p < 0,05$). Auch bei den Freilandtieren bestätigte sich eine Beeinflussung der IPMP-Gehalte durch das Futter. Individuen von *H. axyridis*, die *M. varians* als Futter nutzten, hatten signifikant höhere IPMP-Gehalte als Tiere, die *A. sambuci* oder *B. helichrysi* gefressen hatten (LSD; $p < 0,05$; Abbildung 13). Wurden die Käfer nach dem Schlupf weiterhin mit den Läusen gefüttert, konnte kein signifikanter Unterschied in den IPMP-Gehalten im Vergleich zu den ungefütterten Tieren festgestellt werden (Mann-Whitney-U-Test; $p < 0,05$).

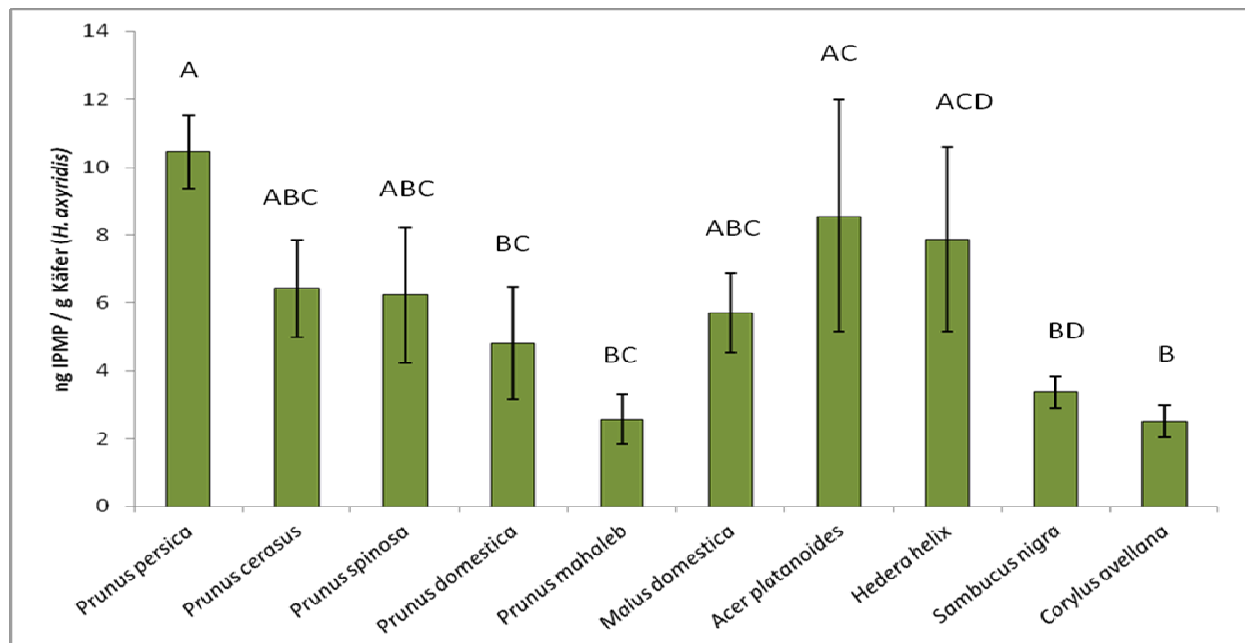


Abbildung 13: IPMP-Gehalte (ng/ g Käfer) von *H. axyridis* +/- Standardfehler als Puppe auf den angegebenen Pflanzen mit definierten Läusen (*M. varians* auf *P. persica* (n=5); *B. helichrysi* auf *P. domestica* (n=7); *D. plantaginea* auf *M. domestica* (n=9); *D. platanoides* auf *A. platanoides* (n=5); *A. hederae* auf *H. helix* (n=5); *A. sambuci* auf *S. nigra* (n=5); Unbekannte Lausarten auf *P. spinosa*, *P. mahaleb*, *P. cerasus* und *C. avellana* (n=5)) gesammelt und 3 Tage nach Schlupf ohne weiteres Futter analysiert. Die Großbuchstaben geben signifikante Unterschiede an (LSD-Test; $p < 0,05$).

Die Ergebnisse widerlegen die Aussage von Cudjoe et al. (2005), dass *H. axyridis* 100fach höhere IPMP-Gehalte als *C. septempunctata* besitzt. Die IPMP-Gehalte waren maximal zweifach höher in *H. axyridis* als im einheimischen Siebenpunkt-Marienkäfer. Diese Ergebnisse bestätigen die in Kapitel 3.2 genannten Resultate und auch die Studie von Botezatu & Pickering (2010), dass es nur geringe Unterschiede in den IPMP-Gehalten der beiden Arten gibt. Da jedoch das Futter während der Larvalentwicklung einen Einfluss auf die IPMP-Gehalte im Käfer hat, können, je nach Verwertbarkeit des Futters, signifikante Unterschiede zwischen den beiden Arten auftreten. Ein Futter, welches im Allgemeinen als nicht optimal für *H. axyridis* bewertet werden kann, lieferte bei den Freilandtieren niedrige IPMP-Gehalte: *M. varians*, eine verwandte Blattlaus zu *M. persicae* ist aus der Literatur als bevorzugte Futterlaus für *H. axyridis* beschrieben worden (Soares et al. 2004; Finlayson et al. 2010). *A. sambuci* ist dagegen aus der Literatur als nicht-optimales Futter für *H. axyridis* bekannt (Ungerova et al. 2010) und ist sogar toxisch für andere Marienkäferarten wie *C. septempunctata* (Nedved 2008). Auch wenn bisher wenig über die Wechselwirkung zwischen der Aufnahme von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen durch Aphididennahrung und andere Insekten bekannt ist (Francis et al. 2000; Alhmedi et al. 2008), so kann dies ein wesentlicher Grund für die unterschiedlichen IPMP-Gehalte sein. Eine höhere Energieaufwendung zur Detoxifizierung der Pflanzeninhaltsstoffe ist für *H. axyridis* zwar möglich, lässt vermutlich jedoch eine geringere Produktion von IPMP in der Hämolymphe zu. Bei *H. axyridis* spielte des Weiteren die Elytrenfarbe bei der Ausprägung der IPMP-Gehalte eine Rolle. Für die gelben Morphotypen wurde dies bereits von Cai et al. (2007) angegeben. Bezzerides et al. (2007) beschrieb den schwarzen Morphotyp von *H. axyridis* ebenfalls als schlechter verteidigt gegenüber Prädatoren als den gelben Morphotyp. Die Gründe für diese Unterschiede sind nicht eindeutig erklärbar. Schwarze Morphotypen haben eine höhere Aktivitätsrate bei niedrigeren Temperaturen (Bezzerides et al. 2007; De Jong et al. 1996; De Jong & Brakefield 1998; Gross et al. 2004; Mitchie et al. 2010). Dies kann ihr Defizit hinsichtlich der geringeren Verteidigung mit Alkaloiden bei geringen Temperaturen ausgleichen.

Anders als bisher angenommen, aufgrund der Publikation von Cudjoe et al. (2005), haben *H. axyridis* und *C. septempunctata* im Hinblick auf die IPMP-Gehalte in der Hämolymphe ein ähnlich hohes Risikopotential den Wein hinsichtlich des Marienkäfertons zu verunreinigen.

3.4 Die geruchsrelevante Substanz des Marienkäfertons im Wein

Nachdem die Verteilung der Methoxypyrazine in der Hämolymphe von *H. axyridis* bereits getestet wurde, blieb die Frage offen, ob es zu Umsetzungsprozessen während der Gärung beim Wein kommen kann. Damit könnte zwar das oben beschriebene IPMP in der Hämolymphe von *H. axyridis* am geruchsintensivsten sein, im Wein jedoch eine andere Substanzkonstellation den Weingeschmack verändern. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden weitere GC-O-Versuche durchgeführt (für die Methodik vergleiche Kapitel 3.2 und Kögel et al. (2012b)). Zum einen wurde ein Kontrollwein der Sorte ‚Riesling‘ ohne jegliche Käferbelastung von sieben Testpersonen einem sensorischen Test unterzogen und die Geruchssubstanzen wurden beschrieben. Zum anderen wurde ein ‚Riesling‘ mit Käferbefall (= Käferwein) geschnüffelt. Der Käferwein stammte aus den Versuchen im Jahr 2010 (siehe 2.1). Dort wurden dem Lesegut 10 *H. axyridis*/ kg Trauben zugegeben und der Wein anschließend nach standardisiertem und gängigem Kellerverfahren vergoren und ausgebaut (siehe Kögel et al. (2012a)).

Insgesamt konnten mehr Geruchssubstanzen im Käferwein erkannt werden als im Kontrollwein. Während 12 Substanzen von mehr als 3 Testpersonen im Kontrollwein beschrieben wurden, wies der Käferwein 21 geruchsaktive Substanzen auf (Abbildung 14). Die einzige Substanz, welche von 100 % der Testpersonen gerochen wurde und nur im Käferwein und nicht im Kontrollwein vorkam, war das Methoxypyrazin IPMP. Das Pyrazin IBMP wurde in beiden Weinen erkannt. Im Wein mit *H. axyridis*-Befall war die Geruchswahrnehmung im Vergleich zum Kontrollwein lediglich um 14 % höher. Hier war vermutlich IBMP natürlicherweise in den Trauben vorhanden.

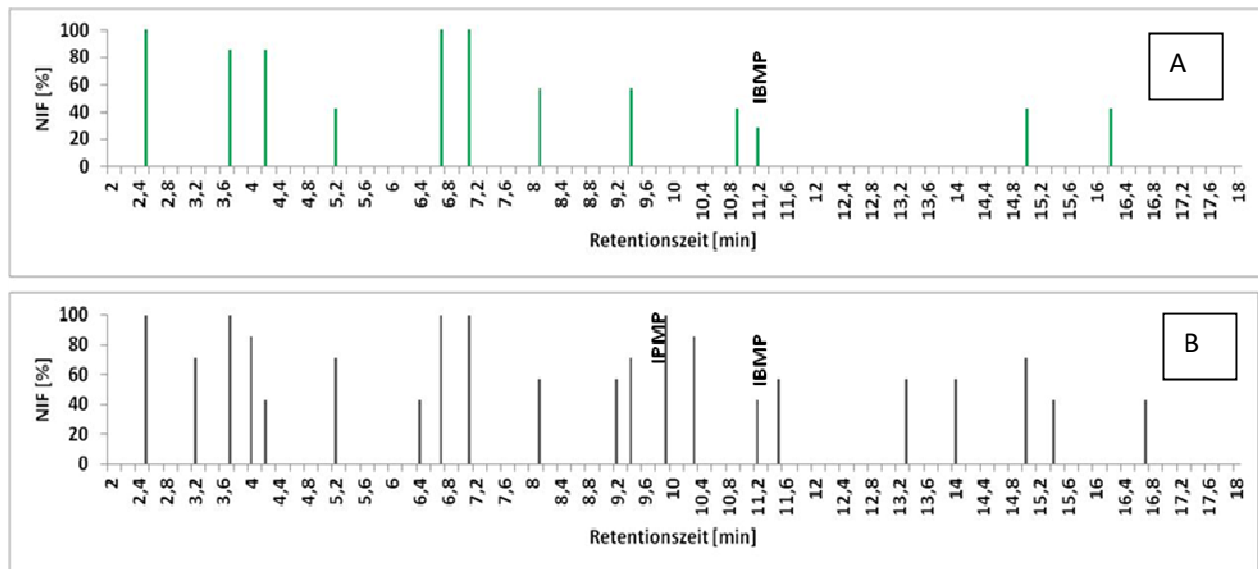


Abbildung 14: Häufigkeit der erkannten geruchsaktiven Substanzen (NIF = Nasal Impact Frequency) [%] in Kontrollwein (A) und Käferwein (10 *H. axyridis*/ kg Trauben) (B) bei definierten Retentionszeiten im GC-O. Die zwei Methoxyppyrazine IPMP und IBMP sind gekennzeichnet.

Wird *H. axyridis* mit den Trauben gepresst, so ist auch im Wein eine deutliche Wahrnehmung von IPMP festzustellen. Dies unterstützt das Ergebnis aus Kapitel 3.2, in dem IPMP ebenfalls in der Hämolymphe des Käfers die geruchsaktivste Substanzklasse war. Auch Pickering et al. (2007a) und Botezatu and Pickering (2010) nannten IPMP als die relevante Substanz zur Verursachung des Marienkäfertons im Wein. Dies widerspricht Ergebnissen von Ross et al. (2010), die IPMP sowohl in der Kontrolle als auch im Käferwein mit gleicher Sensitivität erkannten. Inwieweit jedoch die unterschiedliche chemische Zusammensetzung von Traubensaft und Wein eine Rolle spielt, muss weiter geklärt werden. Die Gärung des Weines könnte die Wahrnehmung von Gerüchen verändern. Daneben sind offenbar weitere, in der vorliegenden Studie jedoch nicht identifizierbare Substanzen in geringerer Ausprägung für den Marienkäfertone verantwortlich. So wurden ebenfalls bei Ross et al. (2010) mehr Substanzen in marienkäferbelastetem Traubensaft mittels GC-O entdeckt als in der Kontrolle. Des Weiteren beschrieben Ross et al. (2010) Phenole als relevante Substanzen, die den Marienkäfertone prägen könnten. In dieser Studie konnten leider nicht alle zusätzlichen Peaks im Käferwein identifiziert werden. Weitere Forschung dazu wäre nötig, um das Zusammenspiel der einzelnen Geruchskomponenten zu verstehen.

4 Das Vorkommen von *Harmonia axyridis* in unterschiedlichen Kulturen innerhalb von Süd-West-Deutschland

Die Ergebnisse der Kapitel 4.1 und 4.2 werden nach Abschluss des Projektjahres im Jahr 2012 als „Research note“ eingereicht. Hierdurch kann noch ein drittes Freilandjahr in die Daten mit aufgenommen werden. Im Folgenden werden bereits die Daten der ersten beiden Jahre 2010 und 2011 dargestellt.

Laut Literatur wurde *H. axyridis* nicht offiziell nach Deutschland zur biologischen Schädlingsbekämpfung verkauft. Jedoch bestehen begründete Vermutungen (C. Hoffmann², persönliches Gespräch), dass er im Palmengarten in Frankfurt und in einem botanischen Garten in Hamburg zur Blattlausbekämpfung eingesetzt wurde. Die ersten Freilandfunde wurden 1998 gemacht (Bathon 2002; Klausnitzer 2002; Tolasch 2002). In den Jahren 2000 und 2002 kam es schließlich zu ersten Massenvermehrungen in Frankfurt und Hamburg (Tolasch 2002). Inzwischen gilt der Asiatische Marienkäfer als flächendeckend verbreitet. Auch die klimatischen Bedingungen schließen ein Vorkommen in Deutschland nicht aus (Bidinger et al. 2010). Über das Vorkommen von *H. axyridis* in deutschen Weinbaugebieten war bisher wenig bekannt. Das Klima begrenzt jedoch eher das Vorkommen von Reben als das Vorkommen von *H. axyridis*. Selbst in kalten Gebieten, wo Weinbau nicht mehr möglich ist, wie Norwegen und Schweden, wurde der Asiatische Marienkäfer bereits gesichtet (Brown et al. 2008; Sathre et al. 2010). Der Käfer ist adaptiert an Temperaturen unter dem Gefrierpunkt und über 30 °C (Lamana & Miller 1998). 2009 wurde der Käfer erstmals fressend an vorgeschädigten Trauben in einem Weinberg in Siebeldingen beschrieben (Kögel 2010). Eine Umfrage im Jahr 2010 unter 400 Winzern sollte einen ersten Anhaltspunkt zum Auftreten von *H. axyridis* in deutschen Weinbergen geben. Befragt wurden die Winzer zu dem Auftreten von *H. axyridis* in ihren Weinbergsanlagen und im Lesegut. Zusätzlich wurde nach der Bewirtschaftung der Anlagen, der Leseform (Handlese oder Vollernter) und den umgebenden landwirtschaftli-

² Leiter Zoologie, Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau, 76833 Siebeldingen

chen Kulturen gefragt. In der Pfalz beantworteten 53 Winzer und aus der Weinbau-region Mosel 50 Winzer den Fragebogen.

Dabei fanden 80 % der antwortenden Winzer in der Pfalz und 50 % an der Mosel *H. axyridis* im Weinberg. Im Lesegut registrierten bereits 52 % der Winzer in der Pfalz und 28 % an der Mosel den Asiatischen Marienkäfer (Abbildung 15). Ein Zusammen-hang zwischen der Bewirtschaftung, Leseform oder umgebenden Kultur und dem Auftreten der Käfer konnte durch die Antworten nicht festgestellt werden.

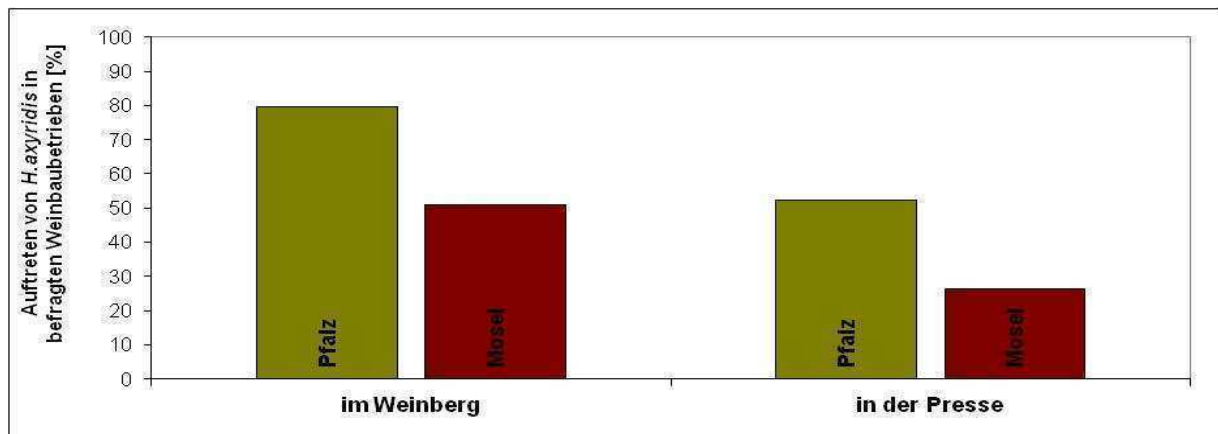


Abbildung 15: Auftreten von *H. axyridis* [%] zum einen im Weinberg und zum anderen in der Presse in den Weinbauregionen Pfalz und Mosel. Umfrageergebnis von je 50 Weinbaubetrieben.

Die Umfrage bestätigte, dass *H. axyridis* durchaus bereits in deutschen Weinbaugebieten vorkommt und dadurch auch mit in den Weinverarbeitungsprozess gelangen kann.

Zahlen zum absoluten Vorkommen von *H. axyridis* in einzelnen Habitaten waren bisher nicht bekannt. Auch fehlten Informationen über die Abundanz der invasiven Art im Verhältnis zu den einheimischen Marienkäferarten. *C. septempunctata* und der 14-Punkt-Marienkäfer *Propylea quatuordecimpunctata* galten bisher als die häufigsten einheimischen Marienkäferarten in Deutschland (Zahradnik 1985). Auch diese beiden Arten sind polyphag und nutzen eine Vielzahl an Habitaten (Klausnitzer & Klausnitzer 1997). Um die Fragen zu klären, wie häufig *H. axyridis* im Vergleich zu den einheimischen Arten vorkommt und welche Kulturen er dabei bevorzugt, wurden in den Jahren 2010 und 2011 Freilandversuche durchgeführt.

Freilandergebnisse bezüglich der Abundanz von verschiedenen Arten müssen jedoch stets unter dem Aspekt der Fängigkeit von Fallen bewertet werden. Der Fangfolg von Arten kann von Farbe, Form oder Position der Falle beeinflusst werden (Mondor & Warren 2000; Musser et al. 2004; Stephens & Losey 2004). Die Wahl von Fallentyp und Fallenfarbe ist somit sehr entscheidend. Deshalb wurde die Fängigkeit der Arten mit gelben Leimfallen im Vergleich zur Klopfpfrobe untersucht (Kapitel 4.1). Die anschließende Fragestellung der Abundanz der verschiedenen Marienkäferarten wird daraufhin im Folgenden in Kapitel 4.2 in Ansätzen beantwortet. Inwieweit die Habitatspräferenzen von *H. axyridis* zur Abschätzung möglicher Einflugsprognosen in deutsche Weinberge genutzt werden können, wird in Kapitel 4.3 erläutert. Zusätzlich ergab sich im Rahmen der Freilanduntersuchungen eine weitere Fragestellung. Da *H. axyridis* bei den Bonituren im Weinberg verstärkt an Reben mit Reblausbefall vorgefunden wurde, sollte mittels Labor- und Freilandversuchen geklärt werden, ob *H. axyridis* auch als Antagonist der Reblaus *Daktulosphaira vitifoliae* fungieren kann (Kapitel 4.4).

4.1 Einfluss der Fallenfarbe und Fangmethode auf den Fangfolg von *H. axyridis*, *C. septempunctata* und *Propylea quatuordecimpunctata*

Zur Bewertung der Fängigkeit der Fallen im Bezug auf die Fallenfarbe wurden im Jahr 2010 und 2011 fünf Leimfallen gleichen Typs (gekreuzte Leimtafeln mit vier rechtwinklig angeordnete Flächen, 15 x 25 cm, Eigenbau), aber unterschiedlicher Farbe (fünf Farben: gelb, grün, blau, rot und weiß), in den Weinbergen des JKI in Siebeldingen aufgehängt und von Anfang April bis Ende Oktober wöchentlich auf das Vorkommen von Coccinellidae untersucht. Die Wiederholungen (n=5) wurden an verschiedenen Standorten ausgebracht, um Standorteffekte zu minimieren. Alle fünf Fallenfarben wurden jedoch nebeneinander platziert. Die Fallen mit unterschiedlichen Farben wurden in den jeweiligen Wiederholungen randomisiert aufgehängt, um außerdem kleinräumige Seiteneffekte auszuschließen. Alle 6-8 Wochen wurden die Fallen neu beleimt (Temmen GmbH, Insektenleim, Artikel-Nr. 201).

Des Weiteren wurden die zwei Fangmethoden, gelbe Leimfallen und Klopfprobe, auf ihre Fängigkeit für die drei Arten, *H. axyridis*, *C. septempunctata* und *P. quatuordecimpunctata* geprüft. Dazu wurden am JKI in Dossenheim in einer Apfelanlage der Sorte „Topaz“ (integrierte Pflanzenschutzmaßnahmen) von Mitte März bis Ende Oktober neben dem Ausbringen von Gelbtafeln auch wöchentlich Klopfproben durchgeführt. Bei der Klopfprobe wurden 10 Äste pro Baum mit jeweils drei Schlägen pro Ast geklopft und im Fangtrichter (66 x 46 x 61 cm) die Anzahl an Coccinelliden gezählt. Als Gelbtafeln dienten im Jahr 2010 einseitige Leimtafeln (n=5) der Größe 22 x 25 cm (Bio-Colortrap, Artikel-Nr.: 256; Temmen GmbH). Im Jahr 2011 wurden gekreuzte Leimtafeln (n=10) verwendet (Typ Rebell amarillo, 21 x 15 cm, Andermatt Biocontrol GmbH). Die Leimtafeln wurden wöchentlich im Feld auf das Vorkommen von Coccinellidae geprüft. Sobald der Leim nur noch eine schlechte Haftung zeigte, wurden die Fallen gegen neue Gelbtafeln ausgetauscht.

ERGEBNISSE

Für *H. axyridis* und *C. septempunctata* wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Farben festgestellt (Abbildung 16). Eine Präferenz für gelbe Leimfallen zeigte sich jedoch bei dem einheimischen Marienkäfer *P. quatuordecimpunctata*: diese Art wurde signifikant häufiger auf den gelben Fallen gefangen als auf den grünen, roten und blauen Leimtafeln (LSD; $p < 0,05$). Bei dem Vergleich der Arten zeigte sich, dass auf den Farben Rot und Blau signifikant weniger Individuen von *C. septempunctata* und *P. quatuordecimpunctata* als *H. axyridis* gefangen wurden (LSD; $p < 0,05$; Abbildung 16).

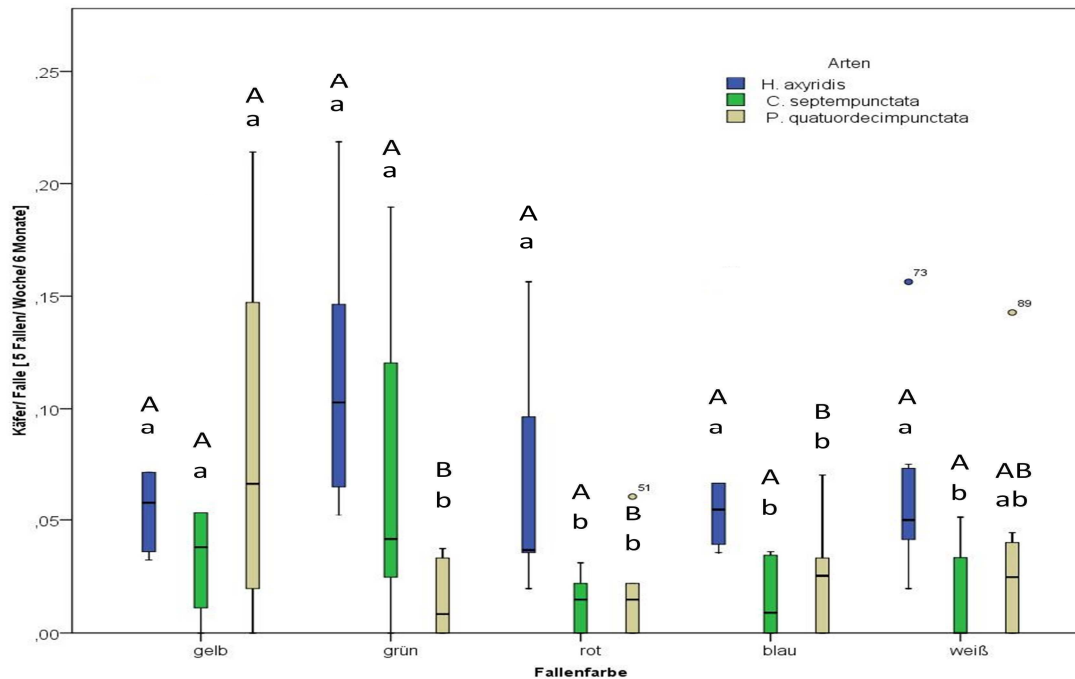


Abbildung 16: Anzahl an Käfern pro Falle [5 Fallen/Woche/6 Monate] gefangen auf Leimfallen des gleichen Typs, aber mit unterschiedlicher Farbe (gelb, grün, rot, blau, weiß) in einem Weinberg in Siebeldingen in den Jahren 2010 und 2011. Die Kleinbuchstaben zeigen signifikante Unterschiede zwischen den Arten innerhalb der Farbe an. Signifikante Unterschiede zwischen den Farben sind mit Großbuchstaben gekennzeichnet. ANOVA LSD-Test $p < 0,05$. Angegeben sind der Median und der Quartilsabstand.

Im Hinblick auf die Fangmethode wurden im Jahr 2010 signifikant mehr Individuen pro Falle und Woche von *H. axyridis* und *C. septempunctata* mittels Klopfprobe gefangen als mit Gelbtafeln (Mann-Whitney-U-test; $p < 0,05$; Abbildung 17). Für *C. septempunctata* waren die Unterschiede auch im Jahr 2011 signifikant unterschiedlich (Mann-Whitney-U-test; $p < 0,05$). Für *P. quatuordecimpunctata* konnte kein Einfluss in der Fangmethode festgestellt werden. Die Fängigkeit mittels beider Methoden war gleich (Mann-Whitney-U-Test; $p > 0,05$) (Abbildung 17).

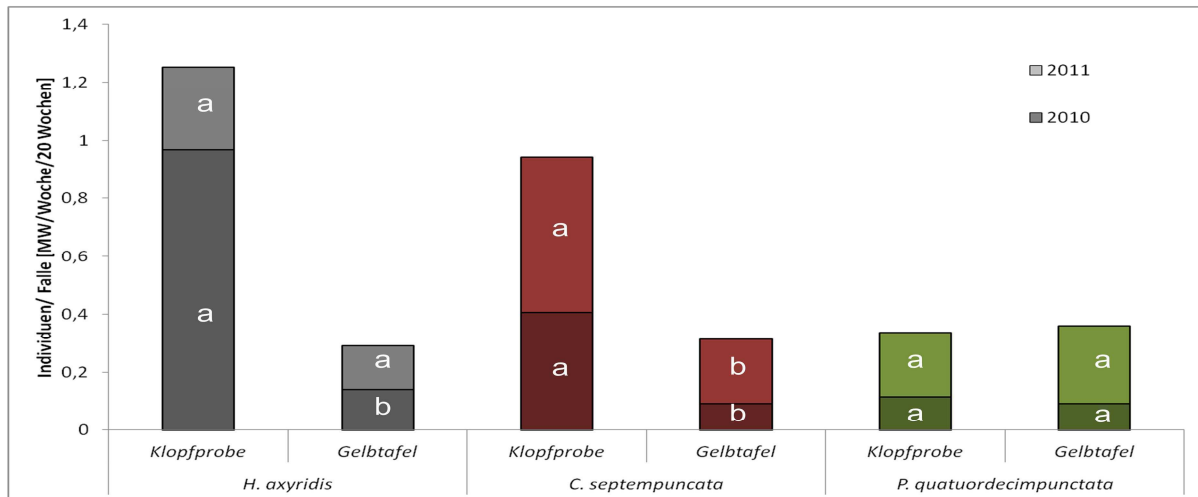


Abbildung 17: Individuen von *H. axyridis*, *C. septempunctata* und *P. quatuordecimpunctata* (MW/ Woche/ 20 Wochen) gefangen in einer Apfelanlage der Sorte „Topaz“ in 2010 (unterer Balken) und 2011 (oberer Balken) am JKI Dossenheim zum einen mittels Klopfprobe und zum anderen mittels Gelbtafeln (die Daten der Gelbtafel sind identisch zu den Daten in Abbildung 18 und werden nur zur besseren Visualisierung nochmal dargestellt). Die Buchstaben geben signifikante Unterschiede zwischen den Fangmethoden aber innerhalb einer Art und eines Jahres an (Mann-Whitney-U-test, $p < 0,05$).

DISKUSSION

Mondor and Warren (2000) beschrieben gelb als die attraktivste Fallenfarbe für *H. axyridis*. Dies konnte in eigenen Versuchen nicht bestätigt werden. Signifikante Unterschiede zwischen den Farben wurden nicht festgestellt. Bei der Etablierung einer Falle für *H. axyridis* sollte zum Ziel gesetzt werden, die Beifänge anderer Arten (vor allem auch anderer Marienkäferarten) gering zu halten. Da keine Unterschiede für *H. axyridis* zwischen den Farben festgestellt werden konnten, sind die Farben rot oder blau den anderen Farben vorzuziehen. Bei diesen Farbfallen war der Beifang sowohl von *C. septempunctata* als auch von *P. quatuordecimpunctata* signifikant geringer.

Während bei der Fallenfarbe keine Präferenz von *H. axyridis* und *C. septempunctata* festgestellt werden konnte (Abbildung 16), hatte die Fangmethode einen bedeutenden Einfluss auf die Fangergebnisse (Abbildung 17). Bereits Stephens and Losey

(2004) betrachteten die unterschiedliche Fängigkeit von *H. axyridis* mittels Gelbtafeln, Sichtbonitur und Netzfang. Auch in deren Ergebnissen waren Sichtbonituren und Netzfang effektiver als Gelbtafeln, die länger als 10 Tage im Feld verblieben. Eine Erklärung der in der vorliegenden Studie ermittelten Unterschiede und denen bei Stephens and Losey (2004) ist vermutlich in der Größe und Stärke der Marienkäfer zu sehen. Den größeren Arten *H. axyridis* und *C. septempunctata*, ist es, im Vergleich zu dem kleineren *P. quatuordecimpunctata*, leichter möglich, sich vom Leim der Gelbtafeln zu befreien. Dabei kann *H. axyridis* noch besser von Leimtafeln entkommen als *C. septempunctata* (Stephens & Losey 2004).

Die Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es durch gelbe Leimfallen zu einer Unterrepräsentierung bei den Abundanzergebnissen der Arten *H. axyridis* und *C. septempunctata* im Vergleich zum Vorkommen von *P. quatuordecimpunctata* kommt.

4.2 Abundanz der Marienkäferarten *H. axyridis*, *C. septempunctata* und *P. quatuordecimpunctata* in Obst- und Feldkulturen

Die Versuche wurden an zwei verschiedenen Standorten durchgeführt. Als Standort A diente das Versuchsfeld des JKI in Dossenheim welches mit unterschiedlichen Obstkulturen bepflanzt ist und als Standort B das JKI-Gelände in Siebeldingen das vorwiegend aus Weinbergen besteht. An Standort A wurden gelbe Leimfallen in eine integriert bewirtschaftete Apfelanlage der Sorten ‚Topaz‘ und ‚Jonagold‘ in 190 cm Höhe gehängt. Zusätzlich wurden gelbe Leimtafeln (2010: n=5; 2011: n=10) in einer Pfirsichanlage (verschiedene Sorten) in 120 cm Höhe ausgebracht. Die Gelbtafeln wurden wöchentlich auf das Vorkommen von Coccinellidae geprüft. Für die genaue Beschreibung der Leimtafeln und Methodik siehe Kapitel 4.1. Der Versuchszeitraum für die Obstkulturen war von März bis Ende Oktober.

Des Weiteren wurde an Standort A wöchentlich die Abundanz an Coccinellidae auf gelben Leimtafeln in zu diesem Zwecke angelegten Sudangras-, Mais- und Sonnenblumenfeldern ermittelt. Im Folgenden die Flächengröße der Felder: Sudangras: Flä-

che 4300 m²; Mais: Fläche 1926 m² ; Sonnenblumen: Fläche 1269 m². Aussaatzeitpunkt war jeweils Ende April. Bewässert wurde nach der Einsaat Anfang Mai und nach dem Auflaufen der Saat bei ca. 30 cm Höhe jeweils ca. 10 mm/m². Danach wurde nicht mehr beregnet. Pflanzenschutzmaßnahmen wurden nicht durchgeführt. Vor Auflauf der Saaten wurden die Flächen mit Stomp und Spectrum gegen Unkräuter behandelt. Die Gelbtafeln (einseitig in 2010 und gekreuzte Fallen in 2011; siehe Kapitel 4.1) wurden in einer Höhe von 1,90 m angebracht und sobald der Leim nur noch schlechte Haftwirkung zeigte, ausgetauscht. Aufgrund der Wachstumszeit der Feldfrüchte war der Boniturzeitraum hier von Anfang August bis Ende Oktober.

An Standort B wurde die Abundanz von *H. axyridis* und anderen Marienkäferarten ebenfalls mittels Fallenfang in Rebanlagen bonitiert. Dazu wurden im Jahr 2010 einseitige Leimgelbtafeln und im Jahr 2011 gekreuzte gelbe Leinfallen verwendet (n=7; Material siehe Kapitel 4.1). Wöchentlich wurden die Tafeln auf Coccinellidae geprüft. Die Rebparzelle wurde ohne Pflanzenschutzmaßnahmen bewirtschaftet. Zusätzlich wurde im September 2011 an Standort B innerhalb dieser Rebparzelle die Häufigkeit von *H. axyridis* an Trauben bonitiert. Dazu wurde diese Parzelle mit 3000 Rebstöcken per Sichtbonitur auf Marienkäfer kontrolliert. Zusätzlich wurden die Krankheiten der jeweiligen Traube (Botrytis, Essigfäule, Schwarzfäule und Grünfäule), auf denen *H. axyridis* gefunden wurde, bonitiert.

ERGEBNISSE

Insgesamt konnten an beiden Standorten zusammen im Jahr 2010 per Fallenfang 286 adulte *H. axyridis*, 141 adulte *C. septempunctata* und 137 adulte *P. quatuordecimpunctata* gefangen werden. Im Jahr 2011 konnten höhere Gesamtfangzahlen ermittelt werden: 341 Individuen von *H. axyridis*, 279 Individuen von *C. septempunctata* und 334 adulte *P. quatuordecimpunctata* wurden gefangen. Pro Falle waren dies 0,02 bis 0,6 Individuen pro Kultur und pro Woche. Alle drei Arten konnten in allen untersuchten Kulturen nachgewiesen werden. *P. quatuordecimpunctata* zeigte eine Präferenz für Pfirsichanlagen. In beiden Jahren wurde er dort signifikant öfter gefangen als *C. septempunctata* und *H. axyridis* (Mann-Whitney-U-test; p<0,001; Abbil-

dung 18). Im Weinberg war *H. axyridis* zahlenmäßig der häufigste Marienkäfer in beiden Jahren. In 2011 war *H. axyridis* signifikant häufiger im Weinberg zu finden als *P. quatuordecimpunctata* und 2010 zusätzlich signifikant häufiger als *C. septempunctata* (Mann-Whitney-U-test; $p < 0,05$; Abbildung 18). Des Weiteren war *H. axyridis* im Jahr 2010 in Rebanlagen signifikant häufiger vertreten als in Apfel- und Pfirsichanlagen (Mann-Whitney-U-test; $p < 0,05$), 2011 konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den Kulturen festgestellt werden (Mann-Whitney-U-test; $p > 0,05$; Abbildung 18). In Rebanlagen wurden im Jahr 2010 die meisten Individuen von *H. axyridis* im Frühjahr (April-Mai) gefangen. Im Herbst befanden sich kaum *H. axyridis* in den Fallen. Im Jahr 2011 wurden dagegen nur wenige adulte *H. axyridis* im Frühjahr mittels Fallenfang gefangen und erst ab Juli kam es zu einem Einflug in den Weinberg. Dieser erreichte seinen Höhepunkt im August.

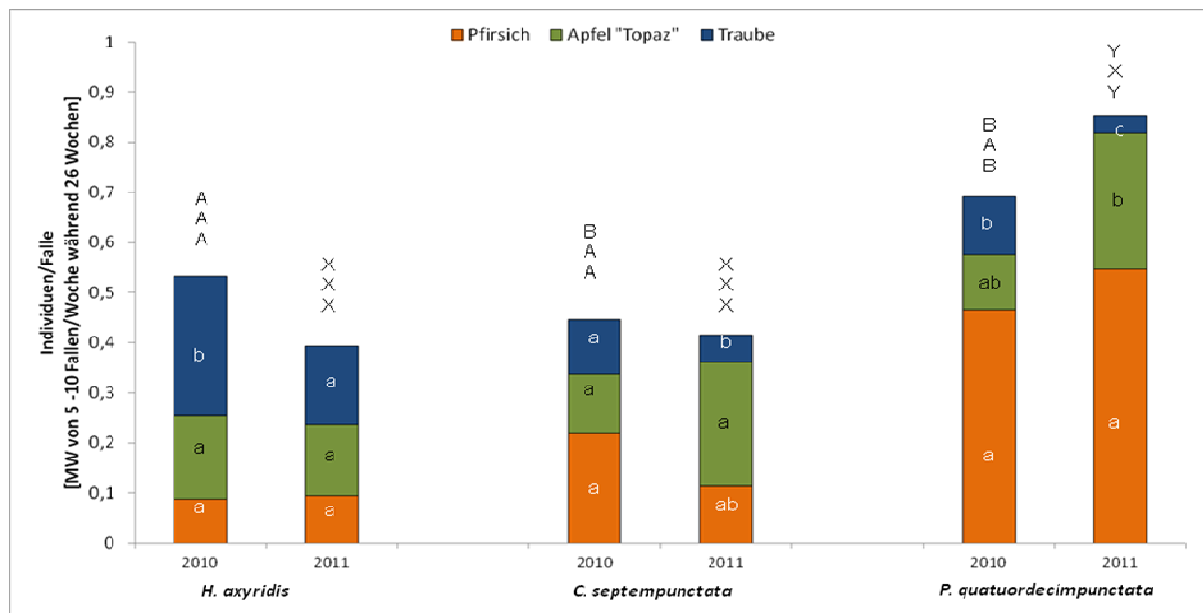


Abbildung 18: Individuen von *H. axyridis*, *C. septempunctata* und *P. quatuordecimpunctata* pro Falle (Mittelwert aus 5 Fallen in 2010 bzw. 10 Fallen in 2011/Woche in 26 Wochen) in einer Pfirsichanlage (orange), Apfelanlage (grün) und im Weinberg (blau) in 2010 und 2011. Die Kleinbuchstaben geben signifikante Unterschiede zwischen den Kulturen innerhalb einer Art und eines Jahres an. Die Großbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Arten innerhalb einer Kultur und eines Jahres. LSD-test $p < 0,05$.

Bei der Bonitur der reifen Trauben im September 2011 wurden 99 Individuen von *H. axyridis* und lediglich 2 Individuen von *C. septempunctata* gefunden. Insgesamt

waren an 54 von 3000 bonitierten Rebstöcken Marienkäfer zu finden. Die Trauben, auf denen *H. axyridis* gefunden wurde, waren durch Risse sowie Pilz- und Bakterienbefall vorgeschädigt. Vornehmlich an Trauben, die mit Essigfäule (87 %) und Botrytis (61 %) befallen waren, wurde *H. axyridis* fressend beobachtet (Abbildung 19). An gesunden Trauben wurde kein Marienkäfer gefunden.

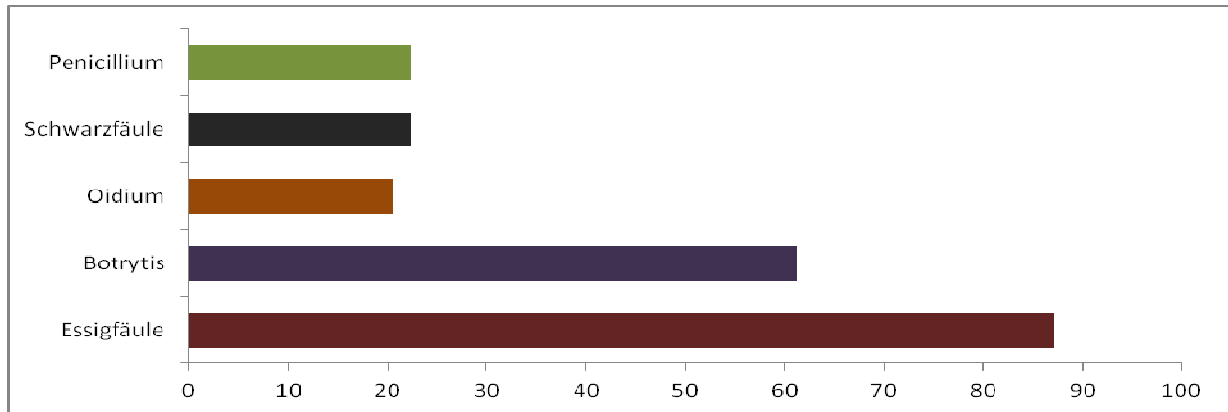


Abbildung 19: Prozentualer Anteil von Krankheiten an Trauben, an denen *H. axyridis* fressend beobachtet wurde. n = 54 Rebstöcke.

In den Feldfrüchten fanden sich ebenfalls alle drei Arten. *C. septempunctata* wurde 2011 signifikant mehr in Sonnenblumen gefangen als die beiden anderen Arten und ebenfalls signifikant mehr als in Sudangras und Mais (Mann-Whitney-U-test; $p < 0,05$; Abbildung 20). *H. axyridis* wurde ebenfalls in großer Abundanz im Sonnenblumenfeld gefangen. Sein Vorkommen war dort signifikant höher als in den beiden anderen Feldkulturen (Mann-Whitney-U-test; $p < 0,05$; Abbildung 20). In 2010 war diese Präferenz jedoch nicht erkennbar.

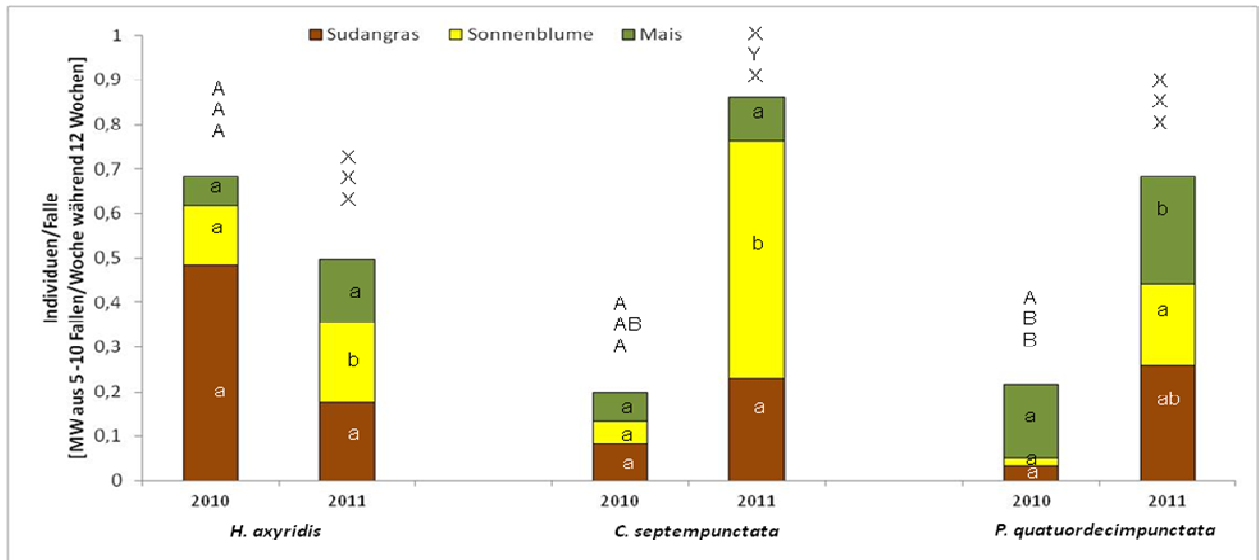


Abbildung 20: Individuen von *H. axyridis*, *C. septempunctata* und *P. quatuordecimpunctata* pro Falle (Mittelwert aus 5 Fallen in 2010 bzw. 10 Fallen in 2011 / Woche in 12 Wochen) in einem Sudangrasfeld (braun), Sonnenblumen (gelb) und in Mais (grün) in 2010 und 2011. Die Kleinbuchstaben geben signifikante Unterschiede zwischen den Kulturen innerhalb einer Art und eines Jahres an. Die Großbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Arten innerhalb einer Kultur und eines Jahres. ANOVA LSD-test $p < 0,05$.

Neben den drei am häufigsten gefangenen Arten wurden weitere Marienkäferarten bestimmt. So konnten *Adalia decimpunctata*, *Adalia bipunctata*, *Calvia quatuordecimguttata*, *Coccinella quinquepunctata*, *Exochomus quadripustulatus*, *Chlorus renipustulatus*, *Halyzia sedecimguttata*, *Vibidia duodecimguttata*, *Stethorus punctillum* und *Psyllobora vigintiduopunctata* in den Kulturen nachgewiesen werden.

DISKUSSION

Um Fehlinterpretationen zu vermeiden sollte bei der Bewertung von Abundanzergbnissen unterschiedlicher Arten stets die Fangmethode beurteilt werden. Denn Aussagen über Abundanzen sind nur dann zulässig, wenn die verwendete Fangmethode für alle Arten eine ähnliche Fängigkeit aufweist. Für die Versuche in der vorliegenden Studie wurden stets gelbe Leimtafeln verwendet. Da dieser Fallentyp, wie in Kapitel 4.2 beschrieben, zu einer Überschätzung der Aktivität und Häufigkeit von *P. quatuordecimpunctata* und eine Unterschätzung der Populationsgröße von

H. axyridis und *C. septempunctata* führen kann, muss die folgende Diskussion unter diesem Aspekt bewertet werden.

Dennoch bestätigen die vorliegenden Ergebnisse Studien aus Belgien, Tschechien, England und der Schweiz, in denen berichtet wurde, dass *H. axyridis* einer der häufigsten 10 Marienkäferarten in Europa geworden ist (Adriaens et al. 2008; Brown et al. 2008; Ameixa et al. 2011; Brown et al. 2011). Wie in England (Brown et al. 2011) war er auch in dieser Studie der am häufigsten gefangene Marienkäfer. Und da für *H. axyridis* eher von einer Unterschätzung der Population aufgrund der Fangmethodik ausgegangen werden kann, bestätigt sich dieses Ergebnis. Gründe der erfolgreichen Etablierung vor anderen Arten sind wahrscheinlich in der Biologie des Käfers zu sehen. Im Vergleich zu *C. septempunctata* und *P. quatuordecimpunctata* weist *H. axyridis* eine geringere Wintersterblichkeit und höhere Fekundität auf (Bazzocchi et al. 2004). Des Weiteren ist er besser gegenüber Krankheitserregern (Gross et al. 2010) und Prädatoren verteidigt (Cottrell & Yeargan 1998; Dutcher et al. 1999; Yasuda & Kimura 2001) und natürliche spezifische Antagonisten sind bisher nicht bekannt. Auch durch eine höhere Generationenzahl pro Jahr, einer höheren Lebensdauer und der Fähigkeit zur Nutzung von nicht optimalen Nahrungsressourcen (Savoiskaya 1970; Koch 2003; Bazzocchi et al. 2004; Pervez & Omkar 2006; Ungerova et al. 2010; siehe auch Kapitel 4.4) kann er sich offenbar besser als andere Arten vermehren und ist konkurrenzstärker.

Brown et al. (2011) beschrieb auch erstmals einen Populationsrückgang der dort heimischen Marienkäferarten *Adalia bipunctata*, *P. quatuordecimpunctata* und *C. septempunctata* in Großbritannien. Da durch eine zweijährige Freilandstudie, wie in dieser Arbeit, noch keine eindeutigen Aussagen über Populationsrückgänge von Arten möglich ist, kann nur die Tendenz festgestellt werden, dass *H. axyridis* Habitatplätze einheimischer Arten besetzt. Und da *C. septempunctata* und *P. quatuordecimpunctata* Arten sind, die aufgrund ihrer Habitatpräferenz und Biologie den größten Überlappungsbereich mit *H. axyridis* aufweisen (Pervez & Omkar 2006; Osawa 2011), ist ein Populationsrückgang dieser Arten in den nächsten Jahren nicht auszuschließen. Für *P. quatuordecimpunctata* ist von einer Überschätzung der Abundanz in den vorliegenden Daten auszugehen, da sowohl gelb die attraktivste

Farbe für die Art darstellte als auch ein Entkommen für die Art von den Leimtafeln schwieriger war als für die anderen beiden Arten (siehe Kapitel 4.1).

Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von *H. axyridis* und Traubenzustand festgestellt werden. Galvan et al. (2006) zeigten bereits einen Zusammenhang zwischen Traubenzustand und Befall mit *H. axyridis*. In deren Studie in Weinbergen von Minnesota wurden vorwiegend Trauben von *H. axyridis* angefliegen die bereits durch Risse sowie Insekten- oder Vogelfraß beschädigt waren. Auch in der vorliegenden Studie wurden Trauben bevorzugt, die bereits mit Essigfäule oder Botrytis befallen waren.

4.3 Einfluss der landwirtschaftlichen Kulturbedingungen auf das Auftreten von *H. axyridis* in den Weinbergen

Vornehmlich zwei Faktoren können die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von *H. axyridis* in den Weinbergen zur Lesezeit erhöhen (Bahlai et al. 2008): da in kühlgemäßigen Weinbauregionen die Traubenreife erst im Spätherbst abgeschlossen ist und somit zu einem Zeitpunkt, an dem Blattlauskolonien in anderen Kulturen rar werden, sind diese Weinbauregionen stärker für Aggregationen von *H. axyridis* in Trauben gefährdet als andere Weinbauregionen. Als zweiter wesentlicher Faktor ist die umgebende Kulturart rund um die Weinberge zu nennen: In Kulturen mit hohen Blattlausdichten in der Flugdistanz rund um die Weinberge kann es im Sommer zu einer Massenvermehrung von *H. axyridis* kommen. Werden diese Kulturen kurz vor der Weinlese geerntet, fehlt eine Futterressource für *H. axyridis* und ein Abwandern in Weintrauben, zum Aufnehmen zuckerhaltiger Flüssigkeit als weitere Energiereserve, ist bevorzugt möglich.

Weshalb diese Bedingungen im „Problemjahr“ 2001 (siehe Kapitel 1.1.3.2) in der Great Lakes-Region, jedoch nicht in anderen Weinbaugebieten (Napa Valley) Nordamerikas, zutrafen, wird im Folgenden erläutert. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen werden die landwirtschaftlichen Bedingungen für das deutsche Weinbaugebiet Pfalz

im Hinblick auf sein Gefährdungspotential für einen Einflug von *H. axyridis* in den Weinberg beurteilt.

In der Great Lakes-Region dominiert Landwirtschaft die Landnutzung (Abbildung 21a). Lediglich 10 % Wald findet sich auf der Niagara-Halbinsel (OMAFRA 2007). 78 % der gesamten Nutzungsfläche wird für die landwirtschaftliche Produktion genutzt. Auf der Niagara-Halbinsel werden darin zu 33 % Sojabohnen als Hauptfrucht angebaut. Auch wenn die Niagara-Halbinsel das größte Weinanbaugebiet Kanadas darstellt und 80 % der Weinproduktion liefert, macht die Traubenmenge darin lediglich 6 % der gesamten landwirtschaftlich genutzten Fläche aus (Abbildung 21b).

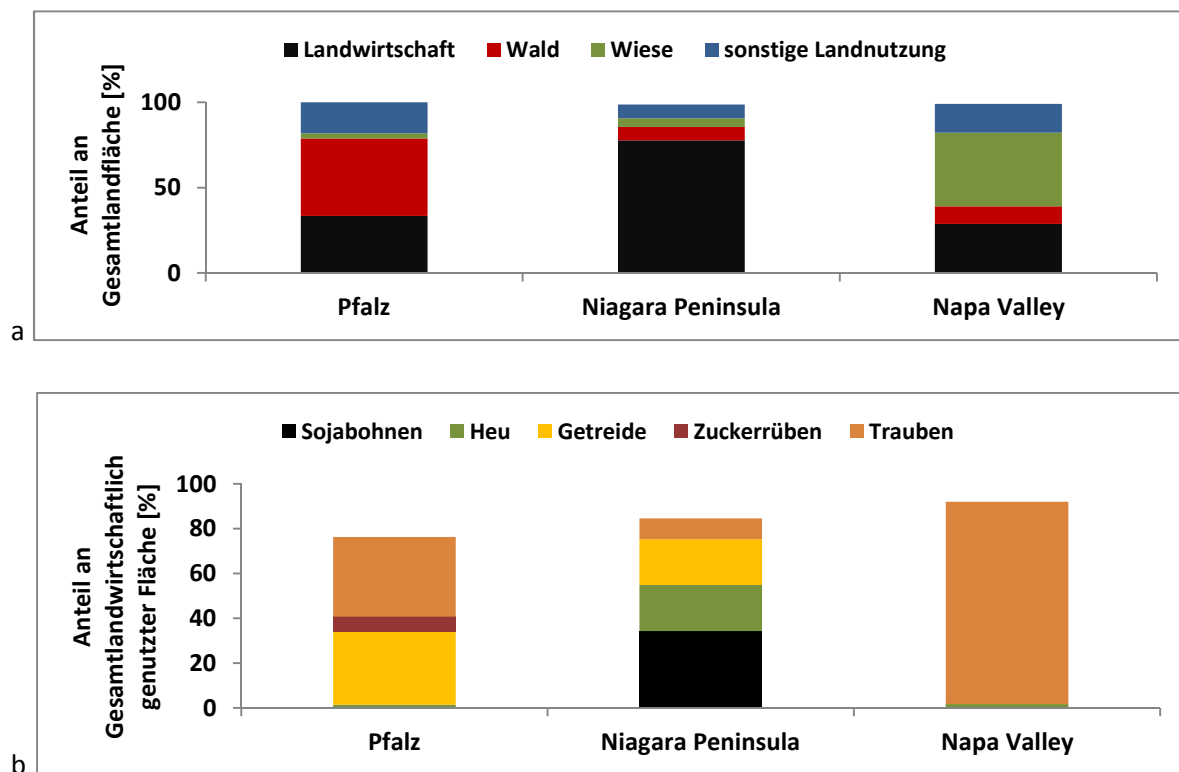


Abbildung 21 a+b: Die Landnutzung in den Weinanbaugebieten Pfalz (Deutschland), Niagara Peninsula (Great Lakes-Region, Niagara-Halbinsel, Nordamerika) und Napa Valley (Kalifornien, Nordamerika) als Anteil an der gesamten Landfläche (a). Der Anteil einzelner Kulturen innerhalb der landwirtschaftlich genutzten Fläche ist in (b) dargestellt.

Optimale Bedingungen zum Aufbau einer hohen Populationsdichte fand *H. axyridis* im Jahr 2001 auf der Niagara-Halbinsel in Sojafeldern. Eine Korrelation zu dem Auftreten in Sojafeldern und Trauben wurde von Bahlai & Sears (2009) untersucht und

konnte als Tendenz bestätigt werden. Ein Grund dieser Korrelation und der hohen möglichen Vermehrungsrate von *H. axyridis* in Sojabohnen liegt offenbar in der Einschleppung einer neuen Blattlausart aus Asien, *Aphis glycines*. Ihr massenhaftes Auftreten wurde im Jahr 2000 das erste Mal auf der Niagara-Halbinsel festgestellt (Ragsdale et al. 2011). Im Jahr 2001 kam schließlich es zu dem massenhaften Auftreten von *H. axyridis* in den Weinbergen, nachdem der Käfer an der Sojablattlaus fressend gesichtet wurde. Vor dem Jahr 2000 spielten Blattläuse an Sojapflanzen eine untergeordnete Rolle (Blackman & Eastop 1984). Die Sojalaus verbreitet sich massenhaft und ist offenbar eine geeignete Futterquelle für *H. axyridis* (Fox et al. 2004; Landis et al. 2004), was sich auch in einer höheren Fekundität zeigt (Mignault et al. 2006). Seit die Applikationsmenge an Insektiziden zur Bekämpfung von *A. glycines* von 2001 bis 2006 um das 130-fache im Vergleich zu dem Jahr 2001 angestiegen ist, hat sich eine Massenvermehrung von *H. axyridis* und ein Einflug in die Weinberge nicht in dem gleichem Ausmaß wie im Jahr 2001 wiederholt (Bahlai 2007 aus (Bahlai & Sears 2009)). Dennoch tritt *H. axyridis* jedes zweite Jahr in höherer Abundanz auf (Bahlai & Sears 2009). Doch auch in anderen Kulturen in der Great Lakes-Region kann es zu einer Massenvermehrung von *H. axyridis* kommen. *H. axyridis* präferiert Blattläuse als Nahrung. Überall dort, wo große Abundanzen an Aphiden auftreten, kann auch häufig *H. axyridis* gefunden werden (Evans 2003). Mais wird ebenfalls in größeren Mengen angepflanzt, ist häufig mit Blattläusen befallen und wird meist kurz vor der Weinlesezeit geerntet. Auch wenn die Anbaufläche von Mais insgesamt nur 6 % der Gesamtnutzfläche ausmacht, ist hierin ein Populationsaufbau von *H. axyridis* möglich. Koch et al. (2006) berichteten von einem verstärkten Auftreten von *H. axyridis* in Mais. Das Fressen der potentiellen Beute in Mais (*Ostrinia nubilalis*) wurde ebenfalls bestätigt (Musser & Shelton 2003).

In anderen Weinbaugebieten Nordamerikas, wie im Napa Valley, dominiert Grasland mit 43 % Anteil an der Gesamtnutzfläche (USDA 2007; Abbildung 21a). Da sich *H. axyridis* als ursprünglicher Strauchbewohner ungern auf Gräsern aufhält (Ameixa et al. 2011), ist hier ein starker Populationsaufbau als unwahrscheinlich zu beurteilen. Wald und landwirtschaftliche Fläche machen zusammen weniger als 40 % aus. Der Weinbau dominiert dabei die landwirtschaftlich genutzte Fläche mit über 90 % (Abbil-

dung 21b). Getreide, Mais oder Sojabohnen werden nicht in der Nähe von Weinbergen angepflanzt. Das Gefährdungspotential für den Weinbau aufgrund landwirtschaftlicher Strukturen ist somit geringer einzuschätzen. Masseneinflüge von *H. axyridis* in den Weinberg wurden bisher nicht beobachtet.

Ein Vergleich der landwirtschaftlichen Kulturen rund um die Weinberge der deutschen Weinbauregion Pfalz zeigt ein höheres Gefährdungspotenzial für ein Auftreten von *H. axyridis* in den Weinbergen als im nordamerikanischen Napa Valley, jedoch ein geringeres Potential als in der Great Lakes-Region.

Der landwirtschaftlich genutzte Anteil in der Pfalz wird mit 34 % der Gesamtfläche angegeben (Statistisches Bundesamt 2007, Abbildung 20a). An landwirtschaftlichen Kulturen, die in manchen Jahren hohe Blattlausmengen haben und kurz vor der Weinlese geerntet werden, kommen Mais, Zuckerrüben und in nassen Jahren auch andere Getreidearten wie Weizen oder Gerste in Frage. Wie in Kapitel 4.2 beschrieben, konnte bereits ein Vorkommen von *H. axyridis* in Maisfeldern in Süd-West-Deutschland bestätigt werden. An Läusen treten in Zuckerrüben vornehmlich *Aphis fabae* und *Myzus persicae* von Mai bis August auf (BISZ 2009). *M. persicae* wurde bisher als präferiertes Futter für *H. axyridis* beschrieben (Alyokhin & Francis 2005; Seko & Miura 2008; Finlayson et al. 2009). Somit wäre ein Populationsaufbau von *H. axyridis* in Zuckerrüben kurz vor der Weinlese theoretisch möglich. Die für die Great Lakes-Region vermuteten ausschlaggebenden Faktoren wie große Sojafelder werden jedoch in der Region Pfalz nicht angepflanzt und auch eine neue Blattlausart aus Asien, die als optimales Futter dienen könnte, ist bisher in Deutschland nicht bekannt.

Des Weiteren dominiert in der Region Pfalz der Wald mit einem Flächenanteil von 45 % an der Gesamtfläche (Abbildung 21a). Die ursprüngliche Habitatpräferenz von *H. axyridis* wird im nativen Gebiet als aborikole Art angegeben (Koch 2003). Auch in Tschechien wurde *H. axyridis*, verglichen mit anderen Kulturen, verstärkt auf Bäumen beobachtet (Ameixa et al. 2011). Ebenfalls Wang (1986) beschreibt eine Reduktion von Aphididen in Kiefernforsten durch den Asiatischen Marienkäfer. Dementsprechend könnte auch der Wald neben deutschen Weinbaugebieten einen potenziellen

Vermehrungsort darstellen. Aphidide in Wäldern haben jedoch die Tendenz, auch noch später im Jahr in Massen aufzutreten. Dadurch könnte ein Abwandern in die Weinberge verhindert werden.

Ein Vergleich der drei Weinanbaustandorte lässt somit die Tendenz erkennen, dass die Landnutzung für das Massenaufreten von *H. axyridis* im Weinbau eine Rolle spielt. Fehlen landwirtschaftliche Kulturen mit hohem Blattlausvorkommen im Sommer, ist eine Massenvermehrung und späteres Auftreten in Weinbergen unwahrscheinlicher. Große Blattlausdichten können sich bei warmen Temperaturen gut entwickeln. Starke Hitze oder Feuchte hemmen jedoch viele Kolonien. Ein Vergleich der Temperaturen in der Great Lakes-Region mit denen im deutschen Weinbaugebiet Pfalz zeigen kältere Winter und heißere Sommer auf der Niagara-Halbinsel (OMAFRA 2007, DLR Agrowetter). Im Hinblick auf die klimatischen Bedingungen für Blattlausvermehrungen und die ökologischen Ansprüche von *H. axyridis* finden sich aber sowohl in der Great Lakes-Region als auch in deutschen Weinbaugebieten geeignete Möglichkeiten für Massenvermehrungen. Infolge der Einführung neuer Arten, auch neuer Aphididen, besteht aber generell eine Gefahr, dass sich das Ereignis aus dem Jahre 2001 in der Great Lakes-Region auch überall anders wiederholen könnte und eine Massenvermehrung von *H. axyridis*, wie es durch das massenhafte Auftreten der Beutetierart *A. glycines* möglich war, stattfinden könnte.

4.4 *H. axyridis* als Antagonist der Reblaus *Daktulosphaira vitifoliae*

Teile dieser Arbeit werden in einem internationalen Journal veröffentlicht und im Folgenden zusammengefasst. Die eingereichte und zur Publikation angenommene Originalarbeit ist dem Anhang angefügt.

Kögel, S., Schieler, M., Hoffmann, C. (2013): The ladybird beetle Harmonia axyridis (Coleoptera: Coccinellidae) as a possible predator of grape phylloxera Daktulosphaira vitifoliae (Hemiptera: Phylloxeridae). European Journal of Entomology. Zur Publikation angenommen.

Die Reblaus *Daktulosphaira vitifoliae* (Fitch 1854) wurde Ende des 19. Jahrhunderts von Nordamerika nach Europa eingeschleppt. Seitdem ist sie in Europa eine der bedeutendsten Schädlinge an Reben. Die Reblaus gehört zur Familie der Zwergläuse (Phylloxeridae). Es wird zwischen der Wurzelreblaus und der Blattréblaus unterschieden. Hierbei handelt es sich nicht um zwei Arten, sondern lediglich um verschiedene Lebensformen der Art (heterogener Generationswechsel). Der Befall mit Wurzelrebläusen, ausschließlich Weibchen, die sich parthenogenetisch vermehren, ist für die europäische *Vitis vinifera*-Rebe von großem Schaden. Durch die Saugtätigkeit der Laus an den Wurzelspitzen entstehen Nodositäten an den jungen Rebwurzeln. Dies führt zu verminderter Wasser- und Nährstoffaufnahme der Rebwurzel und somit zu einer Schwächung der Reben. Die Tuberosität führt letztlich zum Absterben (Schruff 2000). Zusätzlich haben Pilze und Viren die Möglichkeit leichter einzudringen und können dadurch ebenfalls zu einer Schädigung der Reben beitragen

Ein Befall mit der Blattréblaus ist leicht sichtbar an krugförmigen Gallen auf den Blättern. An der Blattoberseite befindet sich der Eingang der Gallen und an der Blattunterseite der Gallenkörper (Schruff 2000). Im Frühjahr schlüpft die sogenannte Maigallenlaus, die durch ihre Saugtätigkeit erste Blattgallen hervorruft und darin kontinuierlich Eier ablegt. Aus den Eiern schlüpfen Jungläuse, die wiederum je eine Blattgalle

bilden und darin Eier ablegen. In Europa treten 4 bis 5 Generationen im Jahr auf. Die letzte Generation schlüpft im Spätsommer (Forneck & Huber 2009).

Bisher waren keine natürlichen Antagonisten der Reblaus bekannt. Die Bekämpfung der Reblaus erfolgt über die Verwendung von Unterlagsreben. Dies bedeutet, dass Pfropfreben angebaut werden, die aus einer wurzelreblauswiderstandsfähigen Amerikaner-Unterlagsrebe und einem aufgepfropften, blattreblausresistenten Edelreis einer Europäer-Rebsorte besteht (Schruff 2000). Damit wird die Reblaus jedoch nicht bekämpft, sondern lediglich in eine nicht-schädigende Daseinsform unterdrückt.

Seit Beginn der 90er Jahre werden wieder verstärkt Rebläuse auch auf Pfropfreben beobachtet (Mohr 2005). Zur Verringerung des Risikos einer erneuten Gradation ist es ratsam, die Reblauspopulation so gering wie möglich zu halten. Dabei könnte ein natürlicher Antagonist hilfreich sein. Marienkäfer als effiziente Lausvertilger könnten bei der Reduktion der Blattreblaus eine Rolle spielen (Mohr 2005). Bisher lagen dazu jedoch keine Ergebnisse vor. Im Jahr 2009 konnte verstärkt *H. axyridis* an Reben mit Rebgallen beobachtet werden (Kögel, eigene Beobachtung).

Um die Prädation der beiden häufigsten Marienkäferarten im Weinberg, *H. axyridis* und *C. septempunctata*, an der Reblaus zu testen, wurden Labor- und Freilandversuche durchgeführt. Dabei stellten sich vorab folgende Fragen:

- Ist die Reblaus ein geeignetes Futter für die beiden Marienkäferarten?
- Wie viele Reblauseier können von *H. axyridis* und *C. septempunctata* konsumiert werden?
- Nutzen die beiden Arten die Reblaus auch als Futterressource unter Freilandbedingungen?

Zur Klärung dieser Fragen wurde in einem Laborversuch die Fraßleistung der beiden Arten an Reblauseiern untersucht. Des Weiteren wurden die Tiere ab dem ersten Larvenstadium exklusiv mit Rebläusen gefüttert und die Fitnessparameter Entwicklungsdauer, Mortalitätsrate und adultes Frischgewicht ermittelt. Ein Freilandversuch wurde jeweils in den Jahren 2010 und 2011 durchgeführt. Dabei wurde das Vor-

kommen von *H. axyridis* und *C. septempunctata* auf Reben mit Reblausgallen im Vergleich zu Reben ohne Gallen verglichen.

Zur Ermittlung der Fraßleistung beider Arten wurden Petrischalen mit definierter Anzahl an Reblauseiern bestückt. Anschließend wurde ein Käfer einer Art in die Petrischale gesetzt und nach 24 h die Anzahl an gefressenen Eiern gezählt. Alle verwendeten Insekten wurden in einem Saubohnenfeld (*Vicia faba*) am JKI in Siebeldingen gefangen und 24 h vor den Versuchen ohne Futter in der Klimakammer gehalten. Beiden Arten wurden zu Beginn 100, 200 und 500 Eier pro Käfer angeboten. Infolge des Resultats wurden für *H. axyridis* weitere Varianten mit 1000, 2000, 3000 und 4000 Eier pro Käfer durchgeführt. Für *C. septempunctata* wurden daraufhin die zusätzlichen Varianten 10, 20 und 50 Eier pro Käfer gewählt.

Im Laborversuch zeigte sich *H. axyridis* als effizienter Prädator von Reblauseiern. *C. septempunctata* konsumierte signifikant weniger Eier als *H. axyridis* (Mann-Whitney-U-Test; $p < 0,05$; Abbildung 22). Während *H. axyridis* auch noch 1000 angebotene Eier innerhalb von 24 h zu 94 +/- 6 % konsumierte, fraß *C. septempunctata* selbst die niedrigste Anzahl an Eiern (10) nur zu 52 +/- 9 %.

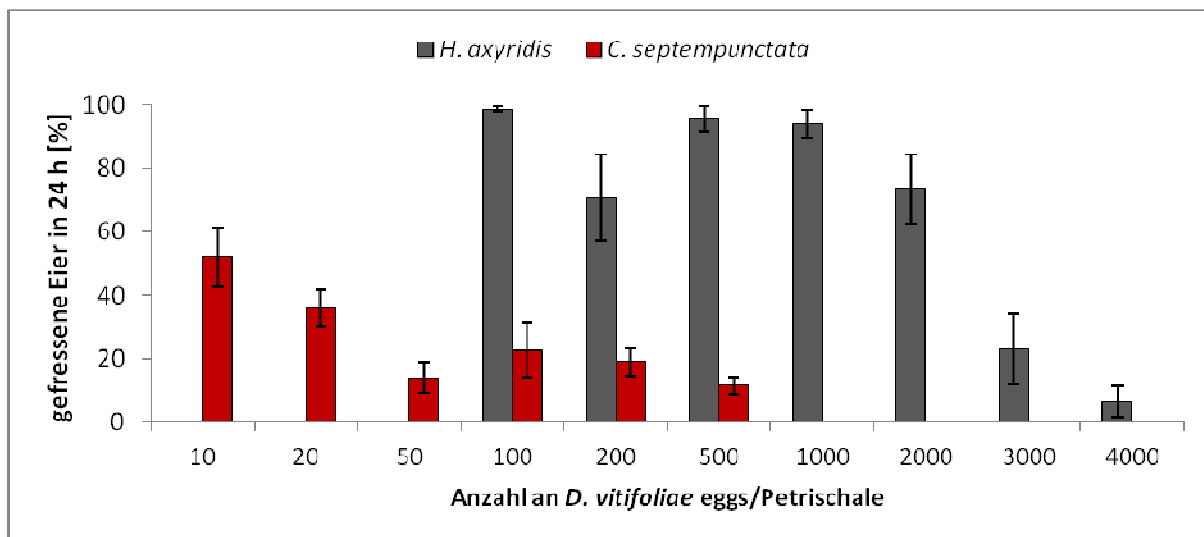


Abbildung 22: Fraßleistung [%] von *H. axyridis* (grau) und *C. septempunctata* (rot) innerhalb von 24 h von einer definierter Anzahl an *D. vitifoliae* Eiern (100, 200, 500, 1000, 2000, 3000 und 4000 Eier/Petrischale für *H. axyridis* beziehungsweise 10, 20, 50, 100, 200, 500 Eier/Petrischale für *C. septempunctata*)

Diese Ergebnisse wurden unterstützt durch die Ergebnisse der Fitnessparameter. In einem weiteren Versuch wurden Petrischalen (Durchmesser = 15 cm) mit jeweils zwei Reblättern entweder mit oder ohne Reblausgallen bestückt. In einer weiteren Variante wurden gefrorene *Ephestia kuehniella*-Eier (500 g) in der Petrischale als Futter angeboten. Pro Petrischale wurde eine Larve des ersten Larvenstadiums zugegeben. Alle 24 h wurde die Entwicklung bonitiert. Alle zwei Tage wurden die alten Blätter entfernt und frische Blätter beziehungsweise frische Eier in die Petrischale gegeben. Dieser Versuchsansatz wurde sowohl für *C. septempunctata* als auch für *H. axyridis* gewählt.

Für *C. septempunctata* konnte *D. vitifoliae* nicht als alleiniges Futter zur Entwicklung genutzt werden. Während *C. septempunctata* sowohl auf Reben mit und ohne Reblausgallen bereits im 2. Larvenstadium eine 100 %ige Mortalität aufwies, konnte sich *H. axyridis* vom 1. Larvenstadium bis zum adulten Tier an Reben mit Reblausgallen entwickeln. Die Entwicklungsdauer betrug hierbei 20,5 +/- 3,9 Tage. Das Adultgewicht lag bei 15 +/- 4 mg. Daraus resultierte ein „suitability parameter (SL)“ (= Entwicklungsdauer/Frischgewicht) von 0,6 +/- 0,2. An Reben ohne Reblausgallen wies *H. axyridis* eine 100 %ige Mortalität auf. Wurde *H. axyridis* mit *E. kuehniella*-Eiern gefüttert, lag die Mortalität bei lediglich 13,3 %. Die gesamte Entwicklung dauerte 14,7 +/- 0,7 Tage. Das Adultgewicht erhöhte sich auf 24,7 +/- 2,5 mg und der SL auf 2,5 +/- 0,4. Die Fitnessparameter bei einer Fütterung mit *E. kuehniella*-Eiern waren damit signifikant besser als bei einer Fütterung mit *D. vitifoliae* (Mann-Whitney-U-test, $p < 0,05$).

Auch wenn *H. axyridis* sich an Rebläusen entwickeln kann, so ist das Futter als nicht optimales Futter anzusehen. Der SL war geringer als bei einer Fütterung mit *E. kuehniella*, welche aus der Literatur als optimales Futter beschrieben wurden (Abdel-Salam et al. 1997, Specty et al. 2003). Bei Fütterungsversuchen mit Aphiden wie *Aphis philadelphi*, *A. fabae* oder *Dysaphis plantaginea* lag der SL $> 1,5$ (Ungerova et al. 2010). Sogar bei einer Fütterung mit *A. sambuci*, der Holunderlaus, war der SL bei 1,1 (Ungerova et al. 2010). *A. sambuci* ist bekannt als eine nicht-optimale Futterlaus für *H. axyridis* und sogar toxisch für *C. septempunctata* (Omkar & Srivastava 2003; Nedved & Salvucci 2008).

Ein geringer SL deutet auf eine lange Entwicklungsdauer und ein geringes Adultgewicht hin. Ein Vergleich dieser beiden Parameter mit Werten bei anderer Fütterung bestätigte die Vermutung, dass es sich bei *D. vitifoliae* um ein nicht-optimales Futter handelt. So resultiert eine Fütterung mit *Acyrtosiphon pisum* oder *Ephestia kuehniella*-Eiern in eine kürzere Entwicklungsdauer von 14-17 Tagen und Adultgewichten zwischen 25 und 35 mg (Specty et al. 2003). Auch die Überlebensrate ist höher mit 80 % im Vergleich zu 47 % in dieser Studie. Ein direkter Vergleich bei einer Fütterung mit *E. kuehniella* unter gleichen Zuchtbedingungen in dieser Studie bestätigte diese Literaturdaten. Temperatur- und Lichtbedingungen sowie die Größe der Zuchtbehältnisse können einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklungsparameter haben (Ungerova et al. 2010). Laborversuche zur Prädation spiegeln jedoch meist nur bedingt die Realität wider. Oftmals verzerren kleinräumige Versuchsbedingungen die Ergebnisse (O'Neil 1997). Deshalb wurde zusätzlich eine Felderhebung durchgeführt.

Die Freilanddaten wurden am JKI Standort in Siebeldingen in einer abgesteckten Rebparzelle mit 3000 Rebstöcken (verschiedene Genotypen mit unterschiedlichen Resistenzen gegenüber der Reblaus) ermittelt. Die Rebparzelle wurde ohne Pflanzenschutzmaßnahmen bewirtschaftet. Jeweils 20 Rebstöcke mit und ohne Rebgallen wurden innerhalb dieser Parzelle in 2010 markiert. In 2011 wurden im selben Feld jeweils 50 Rebstöcke mit und ohne Rebgallen markiert. Dabei wurde darauf geachtet mögliche Standorteffekte auszuschließen. Die Sichtbonitur der markierten Rebstöcke erfolgte wöchentlich auf Coccinellidae. Innerhalb der Rebstöcke mit Reblausgallen, wurde weiter kategorisiert und die Befallsstärke der Reben ebenfalls wöchentlich bonitiert. Die Befallsstärke mit Reblausgallen wurde nach den Richtlinien des Bundesortenamts beurteilt (Anonym 1989). Dabei wurden folgende Kategorien zusammengefasst:

Kat. 1-2 = keine oder nur sehr wenige (<10 % pro Stockfläche) Reblausgallen. Keine Larven, keine Reblauseier (Abbildung 23a)

Kat. 3-5 = wenige Blattgallen (10-40 %), erwartungsgemäß einzelne Larven und keine Eier (Abbildung 23b)

Kat. 6-7 = leicht erkennbare und viele Blattgallen (40-80 %), erwartungsgemäß viele Eier und einige Larven (Abbildung 23c)

Kat. 8-9 = viele große Blattgallen (80-100 %) erwartungsgemäß mit sehr vielen Eiern und Larven (Abbildung 23d)

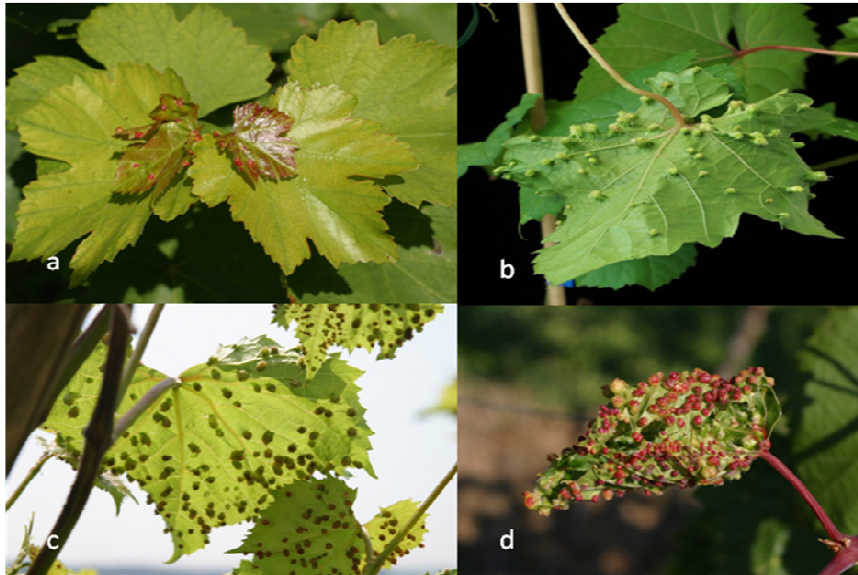


Abbildung 23a-d: Infizierung der Blätter mit Blattgallen von *D. vitifoliae*. Einteilung in Kategorien nach den Richtlinien des Bundessortenamts beurteilt: Kat. 1-2 (a); Kat. 3-5 (b); Kat. 6-7 (c) und Kat. 8-9 (d).

Die Ergebnisse zeigten signifikante Unterschiede des Vorkommens von *H. axyridis* an Reben mit und ohne Reblausgallen (Mann-Whitney-U-test; $p < 0.001$; Abbildung 24). Zwischen den Kat. $< 6-7$ und den Reben der Kat $\geq 6-7$ bestanden ebenfalls signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis-H-test; $p < 0,05$; Abbildung 24). In 2010 wurden 59 adulte *H. axyridis* an Reben mit Rebgallen der Kat. $\geq 3-5$ gefunden. In 2011 waren es 575 adulte Käfer innerhalb dieser Kategorien. An Reben der Kat. 1-2 wurden im Jahr 2010 lediglich 5 Käfer gesichtet und 19 Käfer im Jahr 2011. Diese Unterschiede der Abundanz an Reben mit und ohne Rebgallen lassen vermuten, dass *H. axyridis* auch unter Freilandbedingungen *D. vitifoliae* als Nahrungsquelle nutzt. Andere Beute an den Reben dürfte eine untergeordnete Rolle spielen, da alle bonitierten Rebstöcke mit gleichen Pflanzenschutzmaßnahmen behandelt wurden und die gleichen Standortbedingungen aufwiesen. Somit können die Randbedingungen als gleich betrachtet werden.

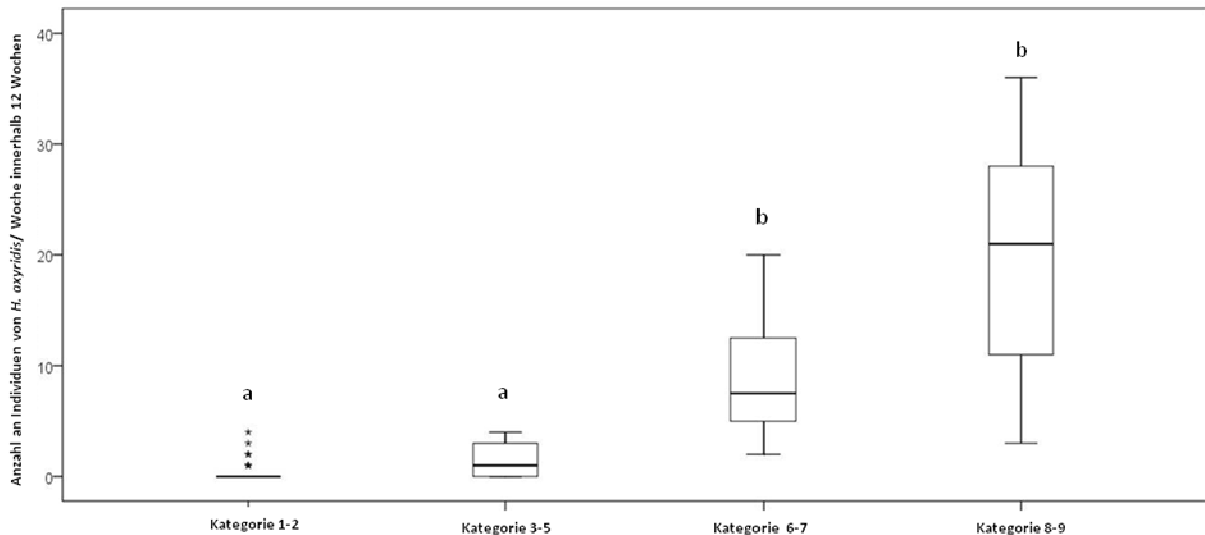


Abbildung 24: Anzahl an Individuen von *H. axyridis* pro Woche (bonitiert über 12 Wochen im Jahr 2011) auf Reben mit den einzelnen Reblauskategorien 1-2, 3-5, 6-7 und 8-9 innerhalb einer Rebparzelle am JKI Siebeldingen. Die Kleinbuchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Kategorien. Der Median Quartilsabstand sind dargestellt.

Die maximale Anzahl an Individuen von *H. axyridis* wurde Anfang August auf Reben, die mit Reblausgallen befallen waren, beobachtet. Zu dieser Zeit wurden auch die höchsten Infizierungsgrade der Rebblätter bonitiert (Abbildung 25). Dies bestätigt Literaturangaben, wonach die Reblaus zu diesem Jahreszeitpunkt ihre letzte Generation ausbildet und mit höchster Abundanz im Weinberg zu erwarten ist (Forneck & Huber 2009). Ende August wandern die Rebläuse in die Wurzeln und nur wenige Läuse verbleiben in den Gallen. Ende August sank auch die Zahl an gesichteten Individuen vom *H. axyridis* an Rebblättern mit Rebgallen. Diese Korrelation zwischen Abundanz an Reblausgallen und Abundanz an *H. axyridis*-Individuen ließe ebenfalls den Schluss zu, dass *H. axyridis* *D. vitifoliae* als Beute nutzt und gezielt aufsucht.

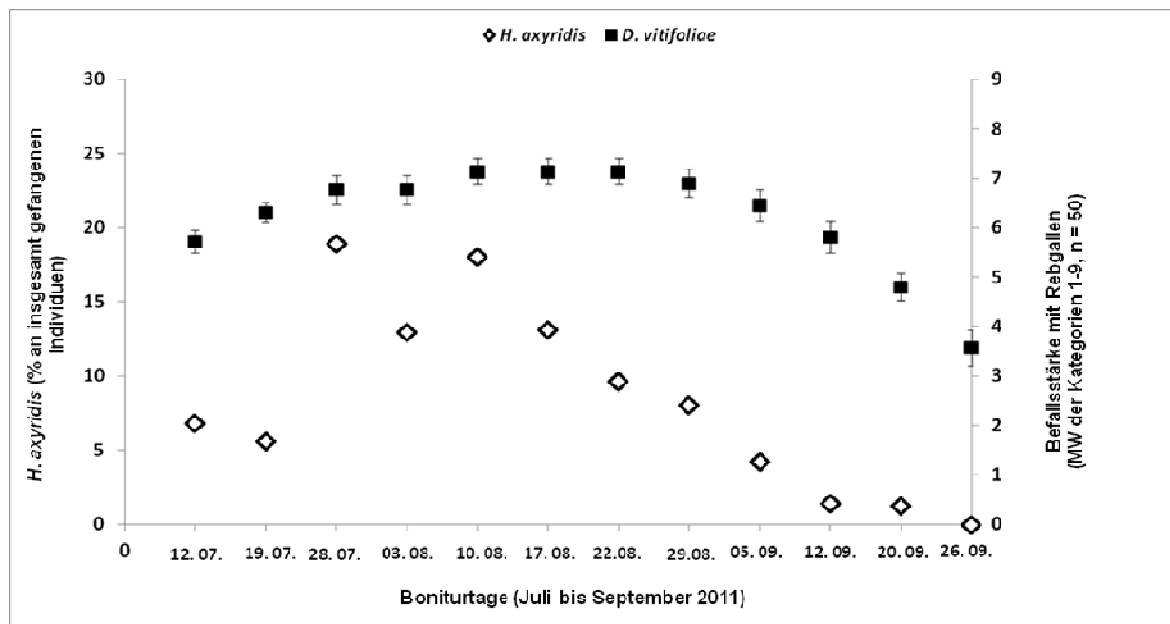


Abbildung 25: Anzahl gefangener Individuen von *H. axyridis* [in % an insgesamt gefangenen Individuen] (Rauten; Y-Achse) und bonitierter Befall von Reblausblattgallenanzahl [MW der Befallsstärke, Kategorien 1-9] (Quadrate; z-Achse) pro Fangtag im Zeitraum von Juli bis September 2011. Die Kategorieneinteilung ist Abbildung 23 zu entnehmen.

Sowohl die Laborergebnisse als auch die Freilandergebnisse zeigen, dass *H. axyridis* ein Antagonist von *D. vitifoliae* ist und damit die Blattreblauskolonien reduzieren kann. Bisher sind Ertragsanlagen meist blattresistent, wenn nicht im Spätsommer von angrenzenden Weinbergsbrachen, Drieschen oder Halden mit verwilderten Rebstöcken, Reblauslarven massiv in den Randbereich von Ertragsweinbergen einwandern. Insofern sind momentan eine Reduktion der Reblaus und ein gezielter Einflug von *H. axyridis* vor allem in diesen Randgebieten zu erwarten. Dabei ist *H. axyridis* gefräßiger als der einheimische *C. septempunctata*. Auch lassen die Ergebnisse vermuten, dass *H. axyridis* ein größeres Beutespektrum nutzen kann als einheimische Arten. Hieraus ergibt sich das Potenzial, hohe Populationsdichten aufzubauen und daraufhin einheimische Arten verdrängen zu können.

5 Schlussfolgerung

Der Asiatische Marienkäfer *Harmonia axyridis* hat sich erfolgreich in Deutschland etablieren können. Auch in den Weinbauregionen Pfalz, Mosel und Franken wird der Käfer jährlich gesichtet, wie Umfrageergebnisse bestätigen. Dabei tritt er bisher in schwankenden Populationsgrößen auf. Während im Jahr 2009 sehr viele Individuen von *H. axyridis* in Weinbergen an Trauben und in der Weinpresse anzutreffen waren (laut Umfrage und eigener Beobachtung), wurden zur Lesezeit in den Jahren 2010 und 2011 kaum Käfer im Weinberg gefunden. Dennoch wurde *H. axyridis* in den beiden Jahren als häufigster Marienkäfer auf Feld- und Obstkulturen mittels gelber Leimfallen bonitiert. *C. septempunctata* und *P. quatuordecimpunctata* waren die zweithäufigsten Marienkäferarten. Zwar konnte wegen des lediglich zweijährigen Untersuchungszeitraumes keine Verdrängung von Arten bewiesen werden, ein Gefahrenpotenzial für andere Arten ist jedoch, aufgrund der im Vergleich zu einheimischen Marienkäferarten hohen Populationsdichte von *H. axyridis*, nicht auszuschließen.

Die Fangmethode zur Beurteilung der Abundanzen einzelner Marienkäferarten spielte eine bedeutende Rolle. Die größeren Arten wie *H. axyridis* und *C. septempunctata* konnten sich leichter von Leimfallen befreien als kleinere Arten. Die Klopfprobe stellte sich für diese beiden Arten als geeignetere Fangmethode dar. Durch den Einsatz von Leimtafeln kann es so zu einer Unterschätzung der Populationsgröße von *H. axyridis* und *C. septempunctata* und einer Überschätzung kleinerer Marienkäferarten kommen. Werden dennoch Leimfallen eingesetzt, so ist die Fallenfarbe ‚rot‘ zu bevorzugen. Mit dieser Fallenfarbe werden gute Fangerfolge von *H. axyridis*, bei gleichzeitig geringem Beifang anderer Marienkäferarten, erzielt.

In Weinbergen des JKI Siebeldingen trat *H. axyridis* in den Jahren 2010 und 2011 im Sommer als Antagonist der Blattreblaus in Erscheinung. Dabei suchte der Käfer gezielt Reben mit Rebgallen von *D. vitifoliae* auf. Diese positive Bedeutung von *H. axyridis* für den Weinbau war bisher unbekannt. Den Ergebnissen nach kann *H. axyridis* somit auch als ein Nützling für den Weinbau betrachtet werden.

Zum anderen kann *H. axyridis* aber auch als Schädling im Weinberg angesehen werden: Eine Beeinflussung des Weingeschmacks durch *H. axyridis* konnte bestätigt werden. Die sensorische Wahrnehmung liegt in ‚Riesling‘ bei 5 Käfer/ kg Trauben. In der roten Sorte ‚Spätburgunder‘ veränderte sich die sensorische Wahrnehmungsschwelle je nach Fermentationstyp bei der Weinbereitung. Während bei einer Maischegärung (6 Tage bei Raumtemperatur) der Trauben die sensorische Wahrnehmung bei 3 Käfer/ kg Trauben lag, erhöhte sich die Schwelle auf 6 Käfer/ kg Trauben bei Maischeerhitzung (3 h bei 65 °C). Folglich kann die sensorische Wahrnehmungsschwelle im Wein bei roten Traubensorten durch Maischeerhitzung statt Maischegärung erniedrigt werden.

Innerhalb dieser Arbeit konnten weitere Maßnahmen identifiziert werden, um den Marienkäferton im Wein zu verringern: Die Pressdauer sowie der Pressdruck in der Weinpresse sind gering zu halten (<2 bar; <60 min), um die Zerquetschung der Käfer und somit den Eintrag von Hämolymphe in den Most zu reduzieren.

Doch nicht nur *H. axyridis*, sondern auch *C. septempunctata* kann den Weingeschmack verändern. Die gleiche Anzahl an Käfern von *C. septempunctata* verursachte einen intensiveren Fehlton als *H. axyridis*. Als Grund dafür konnte das zusätzlich erhöhte Vorkommen des Methoxyprazins IBMP neben IPMP in der Hämolymphe des Siebenpunkt-Marienkäfers identifiziert werden. Dieses war bei *H. axyridis* in nur geringer Menge nachweisbar. IPMP wurde in beiden Käfern als die Substanz mit der höchsten geruchlichen Relevanz in Bezug auf den Marienkäferton identifiziert.

Im Hinblick auf die IPMP-Gehalte in der Hämolymphe von *H. axyridis* geht von *H. axyridis* und *C. septempunctata* ein ähnliches Risikopotential aus. Ein 100fach höherer Gehalt an IPMP in *H. axyridis* im Vergleich zu *C. septempunctata*, wie er von Cudjoe et al. (2005) festgestellt wurde, konnte nicht bestätigt werden. Die Gehalte schwankten zwischen 2 und 12 ng IPMP/ g Käfer in beiden Arten. Dies entspricht im Mittel 0,2 ng/Käfer. Damit ergeben die Pyrazingehalte in einem Käfer und die sensorische Wahrnehmungsschwelle im Wein ein passendes Bild. Fünf Käfer pro 1 kg Trauben in der Presse mit jeweils 0,2 ng IPMP/Käfer können den Wein mit der sensorisch wahrnehmbaren Geruchsschwelle von 1 ng IPMP/ L verunreinigen.

Futter während der Larvalentwicklung konnte als ein Einflussfaktor auf die IPMP-Gehalte beider Arten identifiziert werden. Schlecht verwertbare Blattläuse als Nahrungsquelle führten zu geringeren IPMP-Gehalten als solche, die ein optimales Futter für *H. axyridis* darstellen.

Des Weiteren konnte ein Zusammenhang zwischen den IPMP-Gehalten in *H. axyridis* und der Elytrenfarbe festgestellt werden. Der gelbe Morphotyp *H. axyridis succinea* mit deutlich erkennbaren schwarzen Punkten auf den Elytren hatte signifikant höhere IPMP-Gehalte als der schwarze Morphotyp *H. axyridis spectabilis*.

Zusammenfassend stellt *H. axyridis* durchaus ein Gefährdungspotenzial für den deutschen Weinbau dar. In Jahren, in denen er sich im Herbst von Traubensaft ernährt und in den Weinverarbeitungsprozess gelangt, kann er den Weingeschmack verändern. Dabei ist das höhere Risikopotenzial durch *H. axyridis* jedoch nicht auf höhere Methoxyprazingehalte im Vergleich zu einheimischen Marienkäfern wie *C. septempunctata* zurückzuführen, sondern auf die Biologie des Käfers. Während *C. septempunctata* den Wein durch seinen zusätzlich zu IPMP erhöhten Gehalt an IBMP in der Hämolymphe in noch stärkerem Maße verunreinigen könnte als *H. axyridis*, so sind die Populationsdichten dieses einheimischen Marienkäfers im Vergleich zu *H. axyridis* jedoch meist geringer und das Vorkommen im Weinberg signifikant niedriger. Eine gezielte Bekämpfung von *H. axyridis* zur Lesezeit mit Fallen oder Repellentien sollte vor einer generellen Bekämpfung im Vordergrund stehen, da er auch an Reben zur Spätsommerzeit als Antagonist der Reblaus *D. vitifoliae*, einem bedeutenden Schädling für die Rebe, fungieren kann.

6 Literaturverzeichnis

- ABASSI, S. BIRKETT, M. PETTERSSON, J. PICKETT, J. WADHAMS, L. & WOODCOCK, C. (2000). Response of the seven-spot ladybird to an aphid alarm pheromone and an alarm pheromone inhibitor is mediated by paired olfactory cells. *Journal of Chemical Ecology* **26**(7), 1765-1771.
- ABDEL-SALAM, A.H. ELLINGTON, J.J. EL-ADL, M.A. ABOU EL-NAGA, A.M. & GHANIM, A.A. (1997). Longevity and fecundity of *Harmonia axyridis* adults reared on an artificial diet and pink bollworm eggs. 1st National Conference, Mansoura, 4/5 March 1997, 1, 50/57.
- ADRIAENS, T. BRANQUART, E. & MAES, D. (2003). The Multicoloured Asian Ladybird *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera : Coccinellidae), a threat for native aphid predators in Belgium? *Belgian Journal of Zoology* **133**(2), 195-196.
- ADRIAENS, T. SAN MARTIN Y GOMEZ, G. & MAES, D. (2008). Invasion history, habitat preferences and phenology of the invasive ladybird *Harmonia axyridis* in Belgium. *Biocontrol* **53**(1), 69-88.
- ALLEN, M. S. LACEY, M. J. BROWN, W. V. & HARRIS, R. L. N. (1990). Contribution of methoxypyrazines to the flavour of Cabernet Sauvignon and Sauvignon Blanc grapes and wines. *Proceedings of the 7th Australian Wine Industry Technical Conference* 113-116.
- ALLEN, M. S. LACEY, M. J. HARRIS, R. L. N. & BROWN, W. V. (1991). Contribution of Methoxypyrazines to Sauvignon Blanc Wine Aroma. *American Journal of Enology and Viticulture* **42**(2), 109-112.
- ALLEN, M. S. & LACEY, M. J. (1993). Methoxypyrazine grape flavour: influence of climate, cultivar and viticulture. *Wein-Wissenschaft* **48**(3-6), 211-213.
- ALLEN, M. (1995). Grape and wine flavour analysis. *Chemistry in Australia* **62**(7), 16-17.
- ALLEN, M. S. LACEY, M. J. & BOYD, S. J. (1996). Existence of different origins for methoxypyrazines of grapes and wines. In: *Biotechnology for Improved Foods and Flavors* Eds G. R. Takeoka, R. Teranishi, P. J. Williams & A. Kobayashi), pp. 220-227. Washington: Amer Chemical Soc.

- ALHMEDI, A. HAUBRUGE, E. & FRANCIS, F. (2008). Role of prey-host associations on *Harmonia axyridis* and *Episyrphus balteatus* reproduction and predatory efficiency. *Entomol. Exp. Appl.* **128**, 49-56.
- ALYOKHIN, A. & FRANCIS, F. (2005). Density-dependent regulation in populations of potato-colonizing aphids. *Population Ecology* **47**, 257-266.
- AMEIXA O.M.C.C., A. H., Z.MARTINKOVA P.KINDLMANN (2011). Position of *Harmonia axyridis* in aphidophagous guilds in the Czech Republic. *Benefits and Risks of Exotic Biological Control Agents. IOBC/wprs Bulletin* **58**, 7-14.
- BAHLAI, C. WELSMAN, J. MACLEOD, E. SCHAAFSMA, A. HALLETT, R. & SEARS, M. (2008). Role of visual and olfactory cues from agricultural hedgerows in the orientation behavior of multicolored Asian lady beetle (Coleoptera: Coccinellidae). *Environmental Entomology* **37**(4), 973-979.
- BAHLAI, C. & SEARS, M. (2009). Population dynamics of *Harmonia axyridis* and *Aphis glycines* in Niagara Peninsula soybean fields and vineyards. *Journal of the Entomological Society of Ontario* **140**, 27-39.
- BAKER, G. L. CORNELL, J. A. GORBET, D. W. O'KEEFE, S. F. SIMS, C. A. & TALCOTT, S. T. (2003). Determination of pyrazine and flavor variations in peanut genotypes during roasting. *Journal of Food Science* **68**(1), 394-400.
- BARRA, A. BALDOVINI, N. LOISEAU, A. M. ALBINO, L. LESECQ, C. & CUVELIER, L. L. (2007). Chemical analysis of French beans (*Phaseolus vulgaris* L.) by headspace solid phase microextraction (HS-SPME) and simultaneous distillation/extraction (SDE). *Food Chemistry* **101**(3), 1279-1284.
- BATHON, H. (2002). *Harmonia axyridis*, eine invasive Marienkäferart in Mitteleuropa. *DGaaE-Nachrichten* **16**(3), 109-110.
- BAZZOCCHI, G. G. LANZONI, A. ACCINELLI, G. & BURGIO, G. (2004). Overwintering, phenology and fecundity of *Harmonia axyridis* in comparison with native coccinellid species in Italy. *Biocontrol* **49**, 245-260.
- BERKVEN, N. BONTE, J. BERKVEN, D. DEFORCE, K. TIRRY, L. & CLERCQ, P. (2008a). Pollen as an alternative food for *Harmonia axyridis*. In: *From Biological Control to Invasion: the Ladybird *Harmonia axyridis* as a Model Species*. Eds H. E. Roy & E. Wajnberg, pp. 201-210. Springer Netherlands.
- BERKVEN, N. BONTE, J. BERKVEN, D. TIRRY, L. & DE CLERCQ, P. (2008b). Influence of

- diet and photoperiod on development and reproduction of European populations of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera : Coccinellidae). *Biocontrol* **53**(1), 211-221.
- BEZZERIDES, A.L. MCGRAW, K.J. PARKER, R.S. & HUSSEINI, J. (2007). Elytral color as a signal of chemical defense in the Asian ladybird beetle *Harmonia axyridis*. *Behaviour Ecology Sociobiology* **61**, 1401-1408.
- BIDINGER, K. LOETTERS, S. ROEDDER, D. & VEITH, M. (2010). Species distribution models for the alien invasive Asian Harlequin ladybird (*Harmonia axyridis*). *J. of appl. Entomol.* 1-15.
- BISZ. Beratung und Information für den süddeutschen Zuckerrübenanbau:
http://bisz.suedzucker.de/Pflanzenschutz/BlattSchaedlinge/gruene_Pfirsichblattlaus/
- BLACKMAN, R. L. & EASTOP, V. F. (1984). Aphids on the world's crops: an identification and information guide. John Wiley & Sons, Chichester, New York etc.
- BLAKE, A. KOTSERIDIS, Y. BRINDLE, I. D. INGLIS, D. SEARS, M. & PICKERING, G. J. (2009). Effect of Closure and Packaging Type on 3-Alkyl-2-methoxypyrazines and Other Impact Odorants of Riesling and Cabernet Franc Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**(11), 4680-4690.
- BLAKE, A. KOTSERIDIS, Y. BRINDLE, I. D. INGLIS, D. & PICKERING, G. J. (2010). Effect of light and temperature on 3-alkyl-2-methoxypyrazine concentration and other impact odourants of Riesling and Cabernet Franc wine during bottle ageing. *Food Chemistry* **119**(3), 935-944.
- BOTEZATU, A. & PICKERING, G. (2010). Ladybug (Coccinellidae) taint in wine. In: Reynolds, A. G.: Understanding and Managing Wine Quality and Safety. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, U.K.
- BROWN, M. W. & MILLER, S. (1998). Coccinellidae (Coleoptera) in apple orchards of eastern West Virginia and the impact of invasion by *Harmonia axyridis*. *Entomological News* **109**(2), 143-151.
- BROWN, M. & MATHEWS, C. (2007). Conservation Biological Control of Rosy Apple Aphid, *Dysaphis plantaginea* (Passerini), in Eastern North America. *Environmental Entomology* **36**(5), 1131-1139.
- BROWN, M. & MATHEWS, C. (2008). Conservation biological control of spirea aphid,

- Aphis spiraecola* (Hemiptera : Aphididae) on apple by providing natural alternative food resources. *European Journal of Entomology* **105**, 537-540.
- BROWN, P. M. J. ADRIAENS, T. BATHON, H. CUPPEN, J. GOLDARAZENA, A. HAGG, T. KENIS, M. KLAUSNITZER, B. E. M. KOVAR, I. LOOMANS A.J.M. MAJERUS, M. E. N. NEDVED, O. PEDERSEN, J. RABITSCH, W. ROY, H. E. TERNOIS, V. ZAKHAROV, I. A. & ROY, D. B. (2008). *Harmonia axyridis* in Europe: spread and distribution of a non-native coccinellid. *Biocontrol* **53**, 5-21.
- BROWN, M. W. (2011). Importance of early arrival of adult *Harmonia axyridis* for control of *Aphis spiraecola* on apple. *Biocontrol* **56**, 65-69.
- BROWN, P. FROST, R. DOBERSKI, J. SPARKS, T. HARRINGTON, R. & ROY, H. (2011). Decline in native ladybirds in response to the arrival of *Harmonia axyridis*: early evidence from England. *Ecological Entomology* **36**, 231-240.
- BURGIO, G. SANTI, F. & MAINI, S. (2005). Intra-guild predation and cannibalism between *Harmonia axyridis* and *Adalia bipunctata* adults and larvae: laboratory experiments. *Bulletin of Insectology* **58**(2), 135-140.
- CAI, L. S. KOZIEL, J. A. & O'NEAL, M. E. (2007). Determination of characteristic odorants from *Harmonia axyridis* beetles using in vivo solid-phase microextraction and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry-olfactometry. *Journal of Chromatography A* **1147**(1), 66-78.
- CHAPIN, J. B. & BROU, V. A. (1991). *Harmonia axyridis* (Pallas), the 3rd species of the genus to be found in the United States (Coleoptera, Coccinellidae). *Proceedings of the Entomological Society of Washington* **93**(3), 630-635.
- CODERRE, D. LUCAS, E. & GAGNE, I. (1995). The occurrence of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera, Coccinellidae) in Canada. *Canadien Entomologist* **127**(4), 609-611.
- COLUNGA-GARCIA, M. & GAGE, S. H. (1998). Arrival, establishment, and habitat use of the multicolored Asian lady beetle (Coleoptera : Coccinellidae) in a Michigan landscape. *Environmental Entomology* **27**(6), 1574-1580.
- COTTRELL, T. E. & YEARGAN, K. V. (1998). Intraguild predation between an introduced lady beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera : Coccinellidae), and a native lady beetle, *Coleomegilla maculata* (Coleoptera : Coccinellidae). *Journal of the Kansas Entomological Society* **71**(2), 159-163.

- CUDJOE, E. WIEDERKEHR, T. B. & BRINDLE, I. D. (2005). Headspace gas chromatography-mass spectrometry: a fast approach to the identification and determination of 2-alkyl-3-methoxypyrazine pheromones in ladybugs. *Analyst* **130**(2), 152-155.
- DE ALMEIDA, L. M. & DA SILVA, V. B. (2002). First record of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera, Coccinellidae): A lady beetle native to the Palaearctic region. *Revista Brasileira de Zoologia* **19**(3), 941-944.
- DEJONG, P.W. & BRAKEFIELD, P.M. (1998). Climate and change in clines for melanism in the two-dot ladybird, *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Proc. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **265**, 39-43.
- DEJONG, P.W. GUSSEKLOO, S.W.S. & BRAKEFIELD, P.M. (1996). Differences in thermal balance, body temperature and activity between non melanic and melanic two-dot ladybird beetles (*Adalia bipunctata*) under controlled conditions. *Journal of Experimental Biology*. 2655-2666.
- DETTNER, K. (2010). Insekten als Nahrungsquelle, Abwehrmechanismen. Lehrbuch der Entomologie. Eds K. Dettner & W. Peters, pp. 555-599. Spektrum Akademischer Verlag.
- DLR AGROWETTER:
http://www.am.rlp.de/Internet/global/inetcntr.nsf/dlr_web_full.xsp?src=L941ES4AB8&p1=1PJCNH7DKW&p2=IB26DJ6C96&p3=9IQ84WEY3L&p4=XJPZBV4849
- DUTCHER, J. D. ESTES, P. M. & DUTCHER, M. J. (1999). Interactions in entomology: Aphids, aphidophaga and ants in pecan orchards. *Journal of Entomological Science* **34**(1), 40-56.
- EVANS, E. W. (2003). Searching and reproductive behaviour of female aphidophagous ladybirds (Coleoptera : Coccinellidae): a review. *European Journal of Entomology* **100**(1), 1-10.
- FERRAN, A. NIKNAM, H. KABIRI, F. PICART, J. DEHERVE, C. BRUN, J. IPERTI, G. & LAPCHIN, L. (1996). The use of *Harmonia axyridis* larvae (Coleoptera: Coccinellidae) against *Macrosiphum rosae* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphididae) on rose bushes. *European Journal of Entomology* **93**(1), 59-67.
- FINLAYSON, C. J. LANDRY, K. N. & ALYOKHIN, A. V. (2008). Abundance of Native and

- Non-Native Lady Beetles (Coleoptera: Coccinellidae) in Different Habitats in Maine. *Annals of the Entomological Society of America* **101**(6), 1078-1087.
- FINLAYSON, C. ALYOKHIN, A. GROSS, S. & PORTER, E. (2010). Differential consumption of four aphid species by four lady beetle species. *Journal of Insect Science* **10**(31), 1-10.
- FORNECK, A. & HUBER, L. (2009). (A)sexual reproduction - a review of life cycles of grape phylloxera, *Daktulosphaira vitifoliae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **131**, 1-10.
- FOX, T. B. LANDIS, D. A. CARDOSO, F. F. & DIFONZO, C. D. (2004). Predators suppress *Aphis glycines matsumura* population growth in soybean. *Environmental Entomology* **33**(3), 608-618.
- GALVAN, T. BURKNESS, E. & HUTCHISON, W. (2006). Influence of berry injury on infestations of the multicolored Asian lady beetle in wine grapes. *Plant Health Progress* (June), 1-4.
- GALVAN, T. L. BURKNESS, E. C. VICKERS, Z. STENBERG, P. MANSFIELD, A. K. & HUTCHISON, W. D. (2007). Sensory-based action threshold for multicolored Asian lady beetle-related taint in winegrapes. *American Journal of Enology and Viticulture* **58**(4), 518-522.
- GALVAN, T. KOCH, R. & HUTCHISON, W. (2008a). Impact of fruit feeding on overwintering survival of the multicolored Asian lady beetle, and the ability of this insect and paper wasps to injure wine grape berries. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **128**(3), 429-436.
- GALVAN, T. L. KELLS, S. & HUTCHISON, W. D. (2008b). Determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in lady beetle-infested wine by solid-phase microextraction headspace sampling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**(3), 1065-1071.
- GRILL, C. P. & MOORE, A. J. (1998). Effects of a larval antipredator response and larval diet on adult phenotype in an aposematic ladybird beetle. *Oecologia* **114**(2), 274-282.
- GROSS, J. SCHMOLZ, E. & HILKER, M. (2004). Thermal adaptations of the leaf beetle *Chrysomela lapponica* to different climates of Central and Northern Europe. *Environmental Entomology*. **33**, 799-806.

- GROSS, J. EBEN, A. MUELLER, I. & WENSING, A. (2010). A Well Protected Intruder: The Effective Antimicrobial Defense of the Invasive Ladybird *Harmonia axyridis*. *Journal of Chemical Ecology* **36**(11), 1180-1188.
- HASHIZUME, K. & UMEDA, N. (1996). Methoxypyrazine content of Japanese red wines. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **60**(5), 802-805.
- HESSE, M., MEIER, H., ZEEH, B. (2005). Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. Georg Thieme Verlag.
- HODEK, I. (1973). Biology of Coccinellidae. Czechoslovak Academy of Sciences. Prague, Czechoslovakia.
- HODEK, I. (1996). Food relationships. *Series Entomologica (Dordrecht)* **54**, 143-238.
- HOOGENDOORN, M. & HEIMPEL, G. E. (2002). Indirect interactions between an introduced and a native ladybird beetle species mediated by a shared parasitoid. *Biological Control* **25**(3), 224-230.
- KATSOYANNOS, P. KONTODIMAS, D. C. STATHAS, G. J. & TSARTSALIS, C. T. (1997). Establishment of *Harmonia axyridis* on citrus and some data on its phenology in Greece. *Phytoparasitica* **25**(3), 183-191.
- KLAUSNITZER, B. (1971). Zur Biologie einheimischer Kaferfamilien. 8. Coccinellidae. *Ent Ber Berl* **1971**, 86-97.
- KLAUSNITZER, B. & KLAUSNITZER, H. (1997). Marienkäfer. Westarp Wissenschaften.
- KLAUSNITZER, B. (2002). *Harmonia axyridis* (PALLAS, 1773) in Germany (Col., Coccinellidae). *Entomologische Nachrichten und Berichte* **46**(3), 177-183.
- KOCH, R. (2003). The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: A review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *Journal of Insect Science (Tucson)* **3**.
- KOCH, R. L. HUTCHISON, W. D. VENETTE, R. C. & HEIMPEL, G. E. (2003). Susceptibility of immature monarch butterfly, *Danaus plexippus* (Lepidoptera : Nymphalidae : Danainae), to predation by *Harmonia axyridis* (Coleoptera : Coccinellidae). *Biological Control* **28**(2), 265-270.
- KOCH, R. L. BURKNESS, E. C. & HUTCHISON, W. D. (2006). Spatial distribution and fixed-precision sampling plans for the ladybird *Harmonia axyridis* in sweet corn. *Biocontrol* **51**(6), 741-751.

- KOCH, R. L. & GALVAN, T. L. (2008). Bad side of a good beetle: the North American experience with *Harmonia axyridis*. *Biocontrol* **53**(1), 23-35.
- KÖGEL, S. GROSS, J. & HOFFMANN, C. (2012a). Sensory detection thresholds of 'ladybird taint' in 'Riesling' and 'Pinot noir' under different fermentation and processing conditions. *Vitis* **51** (1), 27-32
- KÖGEL, S. HOFFMANN, C. GROSS, J. & ULRICH, D. (2012b). Diversity and frequencies of methoxypyrazines in hemolymph of *Harmonia axyridis* and *Coccinella septempunctata* and their influence on the taste of wine. *European Food Research and Technology* **234**: 399–404
- KÖGEL, S., EBEN, A., HOFFMANN, C., GROSS, J. (2012c): The influence of diet on fecundity, immune defense and 2-isopropyl-3-methoxypyrazine content of *Harmonia axyridis* Pallas. *Journal of Chemical Ecology*. published online DOI 10.1007/s10886-012-0139-1
- KÖGEL, S., HOFFMANN, C., BATHON, H., GROSS, J., HOMMES, M. (2010). Der Asiatische Marienkäfer - *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) - Schädling oder Nützling. *Informationsblatt des JKI*.
- KOTSERIDIS, Y. S. SPINK, M. BRINDLE, I. D. BLAKE, A. J. SEARS, M. CHEN, X. SOLEAS, G. INGLIS, D. & PICKERING, G. J. (2008). Quantitative analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in juice and wine using stable isotope labelled internal standard assay. *Journal of Chromatography A* **1190**(1-2), 294-301.
- KOVACH, J. (2004). Impact of multicolored Asian lady beetles as a pest of fruit and people. *AmericFan Entomologist* **50**(3), 159-161.
- KOWARIK, I. (2003). Biologische Invasionen. Neophyten und Neozoen in Mitteleuropa. Ulmer, Stuttgart 2003
- KOYAMA, S. & MAJERUS, M. E. N. (2008). Interactions between the parasitoid wasp *Dinocampus coccinellae* and two species of coccinellid from Japan and Britain. From Biological Control to Invasion: the Ladybird *Harmonia axyridis* as a Model Species. Eds H. E. Roy & E. Wajnberg, pp. 253-264. Springer Netherlands.
- LACEY, M. J. ALLEN, M. S. HARRIS, R. L. N. & BROWN, W. V. (1991). Methoxypyrazines in Sauvignon blanc grapes and wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **42**(2), 103-108.

- LAMANA, M. L. & MILLER, J. C. (1996). Field observations on *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae) in Oregon. *Biological Control* **6**(2), 232-237.
- LAMANA, M. L. & MILLER, J. C. (1998). Temperature-dependent development in an Oregon population of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Environmental Entomology* **27**(4), 1001-1005.
- LANDIS, D. A. FOX, T. B. & COSTAMAGNA, A. C. (2004). Impact of multicolored Asian lady beetle as a biological control agent. *American Entomologist* **50**(3), 153-155.
- LAWRENCE, J. F. & NEWTON, A. F., JR. (1995). Families and subfamilies of Coleoptera (with selected genera, notes, references and data on family-group names). *Muzeum i Instytut Zoologii Pan.*
- LENTEREN VAN, J.C. LOOMANS, A. J. M. BABENDREIER, D., BIGLER, F. (2007). *Harmonia axyridis*: an environmental risk assessment for Northwest Europe. *BioControl* **53**, 37–54
- LI, X. ZHAO, X. GONG, S. CHEN, F. TAN, T. & CHENG, A. (2008). The population dynamics and its role in controlling *Eriosoma lanigerum* of *Harmonias axyridis* (Pallas). *Southwest China Journal of Agricultural Sciences* **21**(4), 1165-1168.
- LINDER, C. LORENZINI, F. & KEHRLI, P. (2009). Potential impact of processed *Harmonia axyridis* on the taste of 'Chasselas' and 'Pinot noir' wines. *Vitis* **48**(2), 101-102.
- LUCAS, E. VINCENT, C. LABRIE, G. CHOUINARD, G. FOURNIER, F. PELLETIER, F. BOSTANIAN, N. J. CODERRE, D. MIGNAULT, M. P. & LAFONTAINE, P. (2007). The multicolored Asian ladybeetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera : Coccinellidae) in Quebec agroecosystems ten years after its arrival. *European Journal of Entomology* **104**(4), 737-743.
- MAGNAN, E. M. SANCHEZ, H. LUSKIN, A. T. & BUSH, R. K. (2002). Multicolored Asian ladybeetle (*Harmonia axyridis*) sensitivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **109**(1), S80-S80.
- MAJERUS, M. E. N. & ROY, H. E. (2005). Scientific opportunities presented by the arrival of the harlequin ladybird, *Harmonia axyridis*, in Britain. *Antenna* **29**(3), 196-208.

- MIGNAULT, M. P. ROY, M. & BRODEUR, J. (2006). Soybean aphid predators in Quebec and the suitability of *Aphis glycines* as prey for three Coccinellidae. *Biocontrol* **51**, 89-106.
- MOHR, H. D. (2005). Farbatlas Krankheiten, Schädlinge und Nützlinge an der Weinrebe. Ulmer Verlag
- MONDOR, E. B. & WARREN, J. L. (2000). Unconditioned and conditioned responses to colour in the predatory coccinellid, *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae). *European Journal of Entomology* **97**, 463-467.
- MURRAY, K. SHIPTON, J. & WHITFIELD, F. (1970). 2-methoxypyrazines and flavours of green peas (*Pisum sativum*). *Chemistry & Industry* **27**, 897.
- MUSSER, F. & SHELTON, A. (2003). Predation of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) Eggs in Sweet Corn by Generalist Predators and the Impact of Alternative Foods. *Environmental Entomology* **32**(5), 1131-1138.
- MUSSER, F. R. NYROP, J. P. & SHELTON, A. M. (2004). Survey of predators and sampling method comparison in sweet corn. *Journal of Economic Entomology* **97**(1), 136-144.
- NALEPA, C. A. KIDD, K. A. & AHLSTROM, K. R. (1996). Biology of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) in winter aggregations. *Annals of the Entomological Society of America* **89**(5), 681-685.
- NEDVED, O. & SALVUCCI, S. (2008). Ladybird *Coccinella septempunctata* (Coleoptera : Coccinellidae) prefers toxic prey in laboratory choice experiment. *European Journal of Entomology* **105**(3), 431-436.
- NOBLE, A. C. ELLIOTTFISK, D. L. & ALLEN, M. S. (1995). Vegetative flavor and Methoxypyrazines in Cabernet sauvignon. In *Fruit Flavors: Biogenesis, Characterization, and Authentication* Eds R. L. Rouseff & M. M. Leahy), pp. 226-234. Washington: Amer Chemical Soc.
- O'NEIL, R. (1997). Functional response and search strategy of *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae) attacking Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Environmental Entomology* **26**(6), 1183-1190.
- OBATA, S. (1986). Determination of hibernation site in the ladybird beetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Kontyu* **54**(2), 218-223.

- OMAFRA. Ontario Ministry of Agriculture, food and rural affairs:
<http://www.omafra.gov.on.ca/english/Landuse/info.htm>
- OMKAR & SRIVASTAVA, S. (2003). Influence of six aphid prey species on development and reproduction of a ladybird beetle, *Coccinella septempunctata*. *Biocontrol* **48**(4), 379-393.
- ONGAGNA, P. GIUGE, L. IPERTI, G. & FERRAN, A. (1993). Life-cycle of *Harmonia axyridis* in its area of introduction - South-eastern France. *Entomophaga* **38**(1), 125-128.
- OSAWA, N. (1991). Consequences of sibling cannibalism for the fitness of mother and offspring of the ladybird beetle *Harmonia axyridis*. *SPB Academic Publishing*.
- OSAWA, N. (2011). Ecology of *Harmonia axyridis* in natural habitats within its native range. *Biocontrol* **56**, 613-621.
- PELL, J. K. BAVERSTOCK, J. ROY, H. E. WARE, R. L. & MAJERUS, M. E. N. (2008). Intraguild predation involving *Harmonia axyridis*: a review of current knowledge and future perspectives. In: From Biological Control to Invasion: the Ladybird *Harmonia axyridis* as a Model Species. Eds H. E. Roy & E. Wajnberg, pp. 147-168. Springer Netherlands.
- PERVEZ, A. & OMKAR (2006). Ecology and biological control application of multicoloured Asian ladybird, *Harmonia axyridis*: A review. *Biocontrol Science and Technology* **16**(2), 111-128.
- PICKERING, G. LIN, J. RIESEN, R. REYNOLDS, A. BRINDLE, I. & SOLEAS, G. (2004). Influence of *Harmonia axyridis* on the sensory properties of white and red wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **55**(2), 153-159.
- PICKERING, G. LIN, Y. REYNOLDS, A. SOLEAS, G. RIESEN, R. & BRINDLE, I. (2005). The influence of *Harmonia axyridis* on wine composition and aging. *Journal of Food Science* **70**(2), S128-S135.
- PICKERING, G. LIN, J. REYNOLDS, A. SOLEAS, G. & RIESEN, R. (2006). The evaluation of remedial treatments for wine affected by *Harmonia axyridis*. *International Journal of Food Science and Technology* **41**(1), 77-86.
- PICKERING, G. KER, K. & SOLEAS, G. (2007a). Determination of the critical stages of processing and tolerance limits for *Harmonia axyridis* for 'ladybug taint' in wine. *Vitis* **46**(2), 85-90.

- PICKERING, G. J. KARTHIK, A. INGLIS, D. SEARS, M. & KER, K. (2007b). Determination of ortho- and retronasal detection thresholds for 2-isopropyl-3-methoxypyrazine in wine. *Journal of Food Science* **72**, S468-S472.
- PICKERING, G. SPINK, M. KOTSERIDIS, Y. BRINDLE, I. SEARS, M. & INGLIS, D. (2008a). The influence of *Harmonia axyridis* morbidity on 2-isopropyl-3-methoxypyrazine in 'Cabernet Sauvignon' wine. *Vitis* **47**(4), 227-230.
- PICKERING, G. SPINK, M. KOTSERIDIS, Y. INGLIS, D. BRINDLE, I. SEARS, M. & BEH, A. (2008b). Yeast strain affects 3-isopropyl-2-methoxypyrazine concentration and sensory profile in Cabernet Sauvignon wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **14**(3), 230-237.
- PICKERING, G. J. KARTHIK, A. INGLIS, D. SEARS, M. & KER, K. (2008c). Detection thresholds for 2-isopropyl-3-methoxypyrazine in Concord and Niagara grape juice. *Journal of Food Science* **73**(6), S262-S266.
- PICKERING, G. J. BLAKE, A. & KOTSERIDIS, Y. (2009). Effect of Closure, Packaging and Storage Conditions on Impact Odorants of Wine. *Czech Journal of Food Sciences* **27**, S62-S65.
- PICKERING, G. J. BLAKE, A. J. SOLEAS, G. J. & INGLIS, D. L. (2010). Remediation of wine with elevated concentrations of 3-alkyl-2-methoxypyrazines using cork and synthetic closures. *Journal of Food Agriculture & Environment* **8**(2), 97-101.
- PROUTEAU, C. SCHNEIDER, R. LUCHESE, Y. NEPVEU, F. RENARD, R. & VACA-GARCIA, C. (2004). Improving headspace-solid-phase microextraction of 3-isobutyl-2-methoxypyrazine by experimental design with regard to stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometric analysis of wine. *Analytica Chimica Acta* **513**(1), 223-227.
- RAGSDALE, D. LANDIS, D. A. BRODEUR, J. HEIMPEL, G. E. & DESNEUX, N. (2011). Ecology and Management of the Soybean Aphid in North America. *Annual Review of Entomology* **56**, 375-399.
- RIDDICK, E. W. ALDRICH, J. R. DE MILO, A. & DAVIS, J. C. (2000). Potential for modifying the behavior of the multicolored Asian lady beetle (Coleoptera : coccinellidae) with plant-derived natural products. *Annals of the Entomological Society of America* **93**(6), 1314-1321.

- RIDDICK, E. W. COTTRELL, T. E. & KIDD, K. A. (2009). Natural enemies of the Coccinellidae: Parasites, pathogens, and parasitoids. *Biological Control* **51**(2), 306-312.
- RIESEN, R. (2008). Der Asiatische Marienkäfer im Weinbau. In *Schweiz.Z.Obst-Weinbau* pp. 6-9.
- ROSS, C. F. ROSALES, M. U. & FERNANDEZ-PLOTKA, V. C. (2010). Aroma profile of Niagara grape juice contaminated with multicoloured Asian lady beetle taint using gas chromatography/mass spectrometry/olfactometry. *International Journal of Food Science and Technology* **45**(4), 789-793.
- ROY, H. E. BROWN, P. M. J. ROTHERY, P. WARE, R. L. & MAJERUS, M. E. N. (2008). Interactions between the fungal pathogen *Beauveria bassiana* and three species of coccinellid: *Harmonia axyridis*, *Coccinella septempunctata* and *Adalia bipunctata*. *Biocontrol* **53**(1), 265-276.
- ROY, H. RHULE, E. HARDING, S. LAWSON HANDLEY, L.-J. POLAND, R. RIDDICK, E. & STEENBERG, T. (2011). Living with the enemy: parasites and pathogens of the ladybird *Harmonia axyridis*. *Biocontrol* **56**(4), 663-679.
- SAINI, E. D. (2004). Presence of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) in BS.AS. Province, Argentina. Biological and morphological aspects. Presencia de *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) en la Provincia de Buenos Aires. Aspectos biológicos y morfológicos. *RIA, Revista de Investigaciones Agropecuarias* **33**(1), 151-160.
- SAKAI, T. UEHARA, Y. & MATSUKA, M. (1974). The effect of temperature and other factors on the expression of elytral pattern in the lady beetle *Harmonia axyridis*. *Bulletin of the Faculty of Agriculture Tamagawa University* (14), 33-39.
- SAKURAI, H. KAWAI, T. & TAKEDA, S. (1992). Physiological changes related to diapause of the lady beetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae). *Applied Entomology and Zoology* **27**(4), 479-487.
- SAKURAI, H. KUMADA, Y. & TAKEDA, S. (1993). Seasonal prevalence and hibernating-diapause behavior in the lady beetle, *Harmonia axyridis*. *Research Bulletin of the Faculty of Agriculture Gifu University* **58**, 51-55.

- SALA, C. MESTRES, M. MARTI, M. P. BUSTO, O. & GUASCH, J. (2002). Headspace solid-phase microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines. *Journal of Chromatography A* **953**(1-2), 1-6.
- SALA, C. BUSTO, O. GUASCH, J. & ZAMORA, F. (2004). Influence of vine training and sunlight exposure on the 3-alkyl-2-methoxypyrazines content in musts and wines from the *Vitis vinifera* variety cabernet sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**(11), 3492-3497.
- SALA, C. BUSTO, O. GUASCH, J. & ZAMORA, F. (2005). Contents of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in musts and wines from *Vitis vinifera* variety Cabernet Sauvignon: influence of irrigation and plantation density. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**(7), 1131-1136.
- SASAJI, H. (1971). Coccinellidae (Insecta: Coleoptera). *Fauna Japonica* **1971**, i-ix, 1-340.
- SATHRE, M. G. STAVERLKK, A. & HOFVANG, T. (2010). The history of *Harmonia axyridis* (Pallas 1773) in Norway. *IOBC/wprs Bulletin* **58**, 97-104.
- SAVOISKAYA, G. (1970). Coccinellids of the Alma-Ata reserve. *Trudy Alma Atinskogo Gosudarstvennogo Zapovednika* **9**, 163-187.
- SCHMARR, H. G. GANß, S. KOSCHINSKI, S. FISCHER, U. RIEHLE, C. KINNART, J. & KUTYREV, M. (2010). Pitfalls encountered during quantitative determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in grape must and wine using gas chromatography-mass spectrometry with stable isotope dilution analysis. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry and on-line liquid chromatography-multidimensional gas chromatography-mass spectrometry as potential loopholes. *Journal of Chromatography A* **1217**, 6769-6777.
- SCHRUFT, G. K., H.H. (2000). Krankheiten und Schädlinge der Weinrebe. Mann, Th. .
- SEIFERT, R. BUTTERY, R. GUADAGNI, D. BLACK, D. & HARRIS, J. (1970). Synthesis of some 2-methoxy-3-alkylpyrazines with strong bell-pepper-like odors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **18**, 246-.
- SEKO, T. & MIURA, K. (2008). Functional response of the lady beetle *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) on the aphid *Myzus persicae*

- (Sulzer) (Homoptera: Aphididae). *Applied Entomology and Zoology* **43** (3), 341-345.
- SNYDER, W. E. CLEVENGER, G. M. & EIGENBRODE, S. D. (2004). Intraguild predation and successful invasion by introduced ladybird beetles. *Oecologia* **140** (4), 559-565.
- SOARES, A. O. CODERRE, D. & SCHANDERL, H. (2004). Dietary self-selection behaviour by the adults of the aphidophagous ladybeetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Journal of Animal Ecology* **73**, 478-486.
- SOARES, A. O. BORGES, I. BORGES, P. A. V. LABRIE, G. & LUCAS, E. (2008). *Harmonia axyridis*: What will stop the invader? *Biocontrol* **53**(1), 127-145.
- SPECTY, O. FEBVAY, G. GRENIER, S. DELOBEL, B. PIOTTE, C. PEGEAUX, J.-F. FERRAN, A. & GUILLAUD, J. (2003). Nutritional Plasticity of the Predatory Ladybeetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): Comparison Between Natural and Substitution Prey. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **52**, 81-91.
- STALS, R. & PRINSLOO, G. (2007). Discovery of an alien invasive, predatory insect in South Africa: the multicoloured Asian ladybird beetle, *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera : Coccinellidae). *South African Journal of Science* **103** (3-4), 123-126.
- STATISTISCHES LANDESAMT RHEINLAND-PFALZ:
http://www.statistik.rlp.de/no_cache/veroeffentlichungen/gesamtverzeichnis/
- STEPHENS, E. J. & LOSEY, J. E. (2004). Comparison of sticky cards, visual and sweep sampling of Coccinellid populations in Alfalfa. *Environmental Entomology* **33**(3), 535-539.
- TEDDERS, W. & SCHAEFER, P. (1994). Release and Establishment of *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae) in the southeastern United-States. *Entomological News* **105**, 228-243.
- TOLASCH, T. (2002). *Harmonia axyridis* (Col., Coccinellidae) is rapidly spreading throughout Hamburg: Origin for a colonisation of middle Europe? *Entomologische Nachrichten und Berichte* **46**(3), 185-188.

- UNGEROVA, D. KALUSHKOV, P. & NEDVED, O. (2010). Suitability of diverse prey species for development of *Harmonia axyridis* and the effect of container size. *IOBC/wprs Bulletin* **58**, 165-174.
- WANG, L. Y. (1986). Mass rearing and utilization in biological-control of the ladybeetle *Harmonia axyridis* (Pallas). *Acta Entomologica Sinica* **29**(1), 104-104.
- WARE, R. L. & MAJERUS, M. E. N. (2008). Intraguild predation of immature stages of British and Japanese coccinellids by the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. In: From Biological Control to Invasion: the Ladybird *Harmonia axyridis* as a Model Species. Eds H. E. Roy & E. Wajnberg, pp. 169-188. Springer Netherlands.
- WATANABE, M. (2002). Cold tolerance and myo-inositol accumulation in overwintering adults of a lady beetle, *Harmonia axyridis* (Coleoptera : Coccinellidae). *European Journal of Entomology* **99**(1), 5-9.
- WEIHRAUCH, F. (2008). Surprise attack: The capture of hop garden of the Hallertau through *Harmonia axyridis* in the year 2007 (Coleoptera : Coccinellidae). *Nachrichtenblatt der Bayerischen Entomologen* **57**(1-2), 12-16.
- YARBROUGH, J. A. ARMSTRONG, J. L. BLUMBERG, M. Z. PHILLIPS, A. E. MCGAHEE, E. & DOLEN, W. K. (1999). Allergic rhinoconjunctivitis caused by *Harmonia axyridis* (Asian lady beetle, Japanese lady beetle, or lady bug). *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **104**(3), 704-705.
- YASUDA, H. KIKUCHI, T. KINDLMANN, P. & SATO, S. (2001). Relationships between attack and escape rates, cannibalism, and intraguild predation in larvae of two predatory ladybirds. *Journal of Insect Behavior* **14**(3), 373-384.
- YASUDA, H. & KIMURA, T. (2001). Interspecific interactions in a tri-trophic arthropod system: effects of a spider on the survival of larvae of three predatory ladybirds in relation to aphids. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **98**(1), 17-25.
- ZAHRADNÍK, J. (1985): Käfer Mittel- und Nordwesteuropas - Ein Bestimmungsbuch für Biologen und Naturfreunde. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin

7 Veröffentlichungen der Dissertation

7.1 Internationale Journals

- KÖGEL, S., GROSS, J., HOFFMANN, C. (2012a): Sensory detection thresholds of 'ladybird taint' in 'Riesling' and 'Pinot noir' under different fermentation and processing conditions. *Vitis*. **51** (1): 27-32
- KÖGEL, S., HOFFMANN, C., GROSS, J., ULRICH, D. (2012b): Diversity and frequencies of methoxypyrazines in hemolymph of *Harmonia axyridis* and *Coccinella septempunctata* and their influence on the taste of wine. *European Food Research and Technology*. **234**: 399–404
- KÖGEL, S., EBEN, A., HOFFMANN, C., GROSS, J. (2012c): The influence of diet on fecundity, immune defense and 2-isopropyl-3-methoxypyrazine content of *Harmonia axyridis* Pallas. *Journal of Chemical Ecology*. **38**: 854–864
- KÖGEL, S., SCHIELER, M., HOFFMANN, C. (2012d): The ladybird beetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) as a possible predator of grape phylloxera *Daktulosphaira vitifoliae* (Hemiptera: Phylloxeridae). *European Journal of Entomology*. Zur Publikation angenommen.
- KÖGEL, S., HOFFMANN, C.; GROSS, J.: Phenology of the invasive Multicolored Asian ladybird *Harmonia axyridis* compared to native species (*Coccinella septempunctata* and *Propylea quatuordecimpunctata*) in agroecosystems of Southwestern Germany. In Vorbereitung

7.2 Fachzeitschriften

- KÖGEL, S., GROSS, J., HOFFMANN, C. (2011): Was tun bei Marienkäfern in der Weinpresse?. *Der deutsche Weinbau* 19/2011, 16-18
- KÖGEL, S., HOFFMANN, C., GROSS, J., EBEN, A. (2011): Gepunkteter Asiat. *Landwirtschaftliches Wochenblatt Westfalen-Lippe* 33/2011, 35-36

- GROSS, J., EBEN, A., HOFFMANN, C., KÖGEL, S. (2011): Der Einfluss des invasiven Asiatischen Marienkäfers auf den Obst- und Weinbau in Mitteleuropa. *Obstbau-Weinbau* 7/8-2011, 236-239
- GROSS, J., HOFFMANN, C., KÖGEL, S. (2010): „Der Asiatische Marienkäfer – Nützling oder Schädling“ *OBSTBAU*, 6/2010, 323-326
- GROSS, J., HOFFMANN, C., KÖGEL, S. (2010): „Die Bedeutung des Asiatischen Marienkäfers in Obst- und Weinbau in Deutschland“, *Öko-OBSTBAU* 1/2010, 17-18
- KÖGEL, S., GROSS, J., HOFFMANN, C., BATHON, H., HOMMES, M. (2010): Der asiatische Marienkäfer - *Harmonia axyridis* (Pallas, 1773) - Schädling oder Nützling. Informationsblatt des JKI

7.3 Vorträge

- KÖGEL, S. (2011): Der Asiatische Marienkäfer *Harmonia axyridis* - lästig oder nützlich? Bundesgartenschau 07.09.2011; 04.10.2011, Koblenz
- KÖGEL, S. (2011): Influence of Methoxypyrazines released by *Harmonia axyridis* and *Coccinella septempunctata* on the sensory properties of wine. Entomologentagung 21.-24.03.2011, Berlin
- KÖGEL, S. (2011): Der Asiatische Marienkäfer *Harmonia axyridis* – eine neue Herausforderung für den Weinbau?! Tagung des Forschungsrings Deutscher Weinbau, 07.04.2011, Freiburg
- KÖGEL, S. (2010): Der Asiatische Marienkäfer *Harmonia axyridis* – Schadschwellen bei der Weinbereitung unter Berücksichtigung verschiedener Verarbeitungskonstellationen. 3. Nachwuchswissenschaftlerforum des Julius Kühn-Instituts 23.-25.11.2010, Quedlinburg
- KÖGEL, S. (2010): Der Asiatische Marienkäfer *Harmonia axyridis* - Vorkommen und Wanderungsverhalten in einheimischen Kulturen“ Fachtagung *Harmonia axyridis* 08.-09.07.2010, Geilweilerhof Siebeldingen
- KÖGEL, S. (2010): Der Asiatische Marienkäfer *Harmonia axyridis* – Grundlagen für ein Management des Käfers im Weinbau“ Tagung Forschungsrings Deutscher Weinbau, 12.05.2010, Weinsberg

7.4 Poster

KÖGEL, S., GROSS J., SCHIELER, M., HOFMANN, C. (2011): Predation efficiency of *Harmonia axyridis* and *Coccinella septempunctata* on *Daktulosphaira vitifoliae*, 29.11.-01.12.2011, Nachwuchswissenschaftlerforum, Quedlinburg

KÖGEL, S., GROSS, J., HOFFMANN, C. (2011): *Harmonia axyridis* and *Coccinella septempunctata*: Are both coccinellid species able to influence the sensory properties of wine? IOBC-Tagung (vorbereitet), 04.-06.10.2011, Lacanau

KÖGEL, S., GROSS, J., HOFFMANN, C. (2010): Ein Neuling im Weinberg – Der Asiatische Marienkäfer *Harmonia axyridis*. Pflanzenschutztagung, 06.-09.09.2010, Berlin

8 Anhang

Sensory detection thresholds of "ladybird taint" in 'Riesling' and 'Pinot Noir' under different fermentation and processing conditions

S. KÖGEL¹⁾, J. GROSS²⁾ and C. HOFFMANN¹⁾

¹⁾Julius Kühn-Institute, Federal Research Center for Cultivated Plants, Institute for Plant Protection in Fruit Crops and Viticulture, Siebeldingen, Germany

²⁾Julius Kühn-Institute, Federal Research Center for Cultivated Plants, Institute for Plant Protection in Fruit Crops and Viticulture, Dossenheim, Germany

Summary

The Asian ladybird beetles *Harmonia axyridis* feed on damaged fruits in late summer and in autumn, especially on grapes. By getting harvested and processed together with the grapes, they cause an off-flavor in the wine, the so-called "ladybird taint" (LBT). Depending on fermentation conditions of red wine variety 'Pinot Noir', panelists recognized the LBT at different concentrations: Fewer beetles were required in the non-heated treatment to elicit LBT. The sensory detection threshold for LBT in must fermented wines was about 3 beetles·kg⁻¹ of grapes and in must heated wines it was about 6 beetles·kg⁻¹ of grapes. In the white wine variety 'Riesling', the sensory detection threshold for LBT was at 4 beetles·kg⁻¹ of grapes.

The main olfactory active compound causing LBT, 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazine (IPMP), was detected by 50 % of panelists at a threshold of 1 ng·L⁻¹ in 'Riesling' and 2 ng·L⁻¹ in 'Pinot noir'. Thus, a threshold of five beetles with a specific amount of IPMP each in hemolymph processed within 1 kg of grapes can reach the human detection limit of 1-2 ng IPMP·L⁻¹ of wine.

Modifications in wine processing conditions can reduce the LBT in wines. The mortality of beetles in the wine press can be reduced at pressures less than 2 bar and duration of pressing shorter than 60 minutes.

Key words: *Harmonia axyridis*, ladybird taint, wine processing, sensory detection threshold.

Introduction

Since 2001, the invasive species *Harmonia axyridis* has caused problems in temperate climate viticulture in the USA and Canada (KOCH 2003). During the last years, this species has also started occurring in Central European vineyards (KÖGEL *et al.* 2010). *H. axyridis* is an extremely polyphagous predator of insects, but it also has a preference for ripened and injured fruits (GALVAN *et al.* 2006). When *H. axyridis* feeds on grapes, it may be harvested and processed with the grapes, especially during mechanical harvesting. During processing the coccinellids release their hemolymph in the must by reflex bleeding or crushing. The hemolymph contains remarkable amounts of defensive substances, which can act against microorganisms

(GROSS *et al.* 2010) or as deterrents against natural enemies (KLAUSNITZER and KLAUSNITZER 1997). Additionally, some compounds may act intraspecifically as aggregation pheromones (AL ABASSI *et al.* 1998). These substances cause a specific off-flavor in wine called "ladybird taint" (LBT). This flavor can be described as "bell pepper", "burned peanut butter" or "green vegetables" (PICKERING *et al.* 2004, 2005). The LBT of wine was first described in the USA when millions of individuals of *H. axyridis* feeding within grapes were harvested. It is probably caused by several methoxy-pyrazines (PICKERING *et al.* 2005, GALVAN *et al.* 2008, ROSS *et al.* 2010).

Methoxy-pyrazines are well known from wines processed from grapes of varieties like 'Cabernet Sauvignon', 'Merlot' or 'Sauvignon Blanc'. In typical German varieties like 'Riesling' or 'Pinot Noir' these substances are undesirable because of altering the typicality of wines (PICKERING *et al.* 2005, LINDER *et al.* 2009). Studies by PICKERING *et al.* (2005, 2008 a) described 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazine (IPMP) as the main component causing this off-flavor. In hemolymph of *H. axyridis* IPMP was detected with highest sniffing intensity compared to other methoxy-pyrazines (KÖGEL *et al.* 2012). According to CAI *et al.* (2007), the hemolymph of the invasive ladybird beetle contains IPMP in an average concentration of 0.16 ng·beetle⁻¹.

PICKERING *et al.* (2007 b), LINDER *et al.* (2009) and GALVAN *et al.* (2007) determined or estimated sensory detection thresholds (SDT) of the LBT in several varieties. For 'Riesling', PICKERING *et al.* (2007 b) extrapolated a SDT of around 1.5 beetles·kg⁻¹ of grapes (that 75 % of test persons had detected) for blended wines (Control: LBT-wines). The LBT in 'Pinot Noir' was reviewed by LINDER *et al.* (2009), estimating a SDT of 1 beetle·kg⁻¹ of grapes.

Must fermentation is the traditional and desired way to process red wine. In Central Europe a second type of processing, the so-called must heating, is often used. The wine processing conditions which may affect the development of LBT during the first steps of processing have only been analyzed by a few publications. It has been found that reflex bleeding of live beetles had a lower impact on LBT than total crushing and death of beetles (PICKERING *et al.* 2007 b, GALVAN *et al.* 2007). Other factors that can influence the LBT or methoxy-pyrazines, respectively, in infested wine are as follows: the type of bottle closures (PICKERING *et al.* 2010, 2009, BLAKE *et al.* 2009), the type of packaging and storage conditions (PICKERING *et al.* 2009, BLAKE *et al.* 2009). Several yeast strains (PICKERING *et al.* 2008 b)

or treatments with oak chips or activated charcoal (PICKERING *et al.* 2006), may improve the taste of wine. PICKERING *et al.* (2007 b) announced that processing variables such as maceration technique, pressing regime or must heating may also affect IPMP transfer from the ladybird beetle into the wine. Until now, no further studies were conducted investigating the influence of these processing conditions on LBT in wine.

Therefore, in this study, both processing types (must heating and must fermentation) as well as pressing duration and pressure were compared with regards to their possible impact on LBT in wines from *H. axyridis* infested grapes. Also solutions for the reduction of LBT in wine at the beginning of processing are suggested and the sensory detection threshold of LBT in German wines spiked with methoxy-pyrazines and live adults of *H. axyridis* is specified. The sensory detection thresholds of methoxy-pyrazines and adult beetles for two common German wine varieties 'Riesling' and 'Pinot Noir' in dependence of different fermentation conditions are defined. Unlike previous studies, the data in this study were not extrapolated or estimated, but measured by adding live beetles to the grapes in different amounts.

Material and Methods

Insects: *H. axyridis* adults were collected during September 2009 in vineyards located close to the Julius Kühn-Institute in Siebeldingen. The beetles were kept at 9 °C in plastic jars in a refrigerator without food or water for one week. Twenty-four h prior to the experiments, the beetles were kept at 22 °C under daylight conditions.

Beetle mortality as a function of pressure: Nine adult *H. axyridis* were added to 3 kg of grapes ('Riesling'). The grapes were pressed in a pneumatic press (Type 6030, Willmes, Lorsch, Germany) at pressures between 1-5 bar. The variants at 2 and 5 bar were repeated 5 times to check the possible variation between the pressing procedures. Experiments at 1, 3 and 4 bar were repeated twice. All experiments were done using destemmed grapes, respectively. Beetles were collected out of the wine press by hand after pressing (15 min) and examined for mortality or damage. As ladybird beetles are known to feign death (thanatosis) when they have been disturbed, the individuals supposed dead checked again for locomotion activity for 24 h by aligning them upside-down in petri dishes. Those who had moved were considered alive. Those who stayed upside-down aligned were considered dead.

Beetle mortality as a function of pressing time: 15 kg 'Riesling' grapes were infested with 15 live beetles. The grapes were pressed for 90 min at 2 bar. After 30, 60 and 90 min the mash was mixed, the press stopped and the beetles inside the press were examined for mortality and injuries. Before continuing the pressing procedure, the predamaged beetles were reintroduced into the mash.

Processing 'Riesling' grapes infested with different numbers of beetles: In 2009, different numbers of adult beetles (0, 1, 2, 3, 4, 6, 8,

or 20) were added to each 5 kg of 'Riesling' grapes ($n = 2$). Afterwards, grapes and beetles were pressed at 5 bar using a pneumatic press (Type 6030, Willmes). The must was filled in 5-L jugs, and sulphur dioxide was added to a final concentration of 50 mg·L⁻¹. The must was inoculated with yeast (Erbslöh Önoferm Freddo, 10 g·100 L⁻¹) for fermentation under room conditions (18-20 °C). After fermentation, an additional 100 mg·L⁻¹ sulphur dioxide was added. After three weeks, the wine was separated from the yeast and decanted into several 0.5 L-bottles. Sparging with inert gas before bottling was not necessary due to the sensory assessment only two month later. The wines were tested by a sensory panel as described below (organoleptic testing procedure).

The trials were repeated in 2010 with reduced variants and amounts of grapes, but higher repetition numbers. 1 kg of 'Riesling' grapes were infested with 1, 5 and 10 adult beetles ($n = 5$). The grapes were pressed (at 5 bar) and the resulting must filled in 1 L-glass jugs. The further processing was the same as described above. The organoleptic properties of these wines were tested again by a sensory panel as described below.

Processing 'Pinot Noir' grapes infested with different numbers of beetles under different conditions: Due to the high numbers of live beetles necessary for each experiment, the trials were not repeated. Each 15 kg of 'Pinot Noir' were infested with 0, 1, 2, 3, 4, or 10 adult beetles per kg of grapes, and transferred to 20-L-containers. In the first set of experiments, the must was fermented for 6 d (must fermentation), while in the second set of experiments the grapes were heated for 3 h in a water bath adjusted to 65 °C (must heating). Afterwards, the grapes were pressed with a pneumatic wine press (UVAmat, custom-made product, FH Geisenheim) at 2 bar and transferred to 15 L-glass bottles. After 3 weeks the wines were racked (Erbslöh Önoferm Freddo, 10 g·100 L⁻¹) and 100 mg·L⁻¹ sulphur dioxide was added to the wine. The wines were tested by a sensory panel as described in the paragraph "organoleptic testing procedure".

Determining sensory detection thresholds of synthetic pyrazine IPMP in 'Riesling' and 'Pinot Noir' wine. A standard solution of 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazine (IPMP) (Sigma Aldrich, Germany, 1 g/mL) was diluted three times in water-ethanol-solutions (10 µl per standard solution in 9 mL Milli-Q-water + 1 mL ethanol pA) to a final concentration of 10 ng·L⁻¹ IPMP. Five bottles containing one year old 'Riesling' wine (filled in 2008) were inoculated with 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazine (IPMP) in concentrations of 1, 2, 11, 50 and 100 ng·L⁻¹. Five bottles containing one year old 'Pinot Noir' were inoculated with IPMP in concentrations of 1, 3, 11, 50, and 100 ng·L⁻¹. The wines were tested by a sensory panel as described below.

Organoleptic testing procedure: A panel of ten persons (age 26-53 years; 2 females and 8 males; regularly winesensory trained) tasted in three tasting sessions (orthonasal and retronasal) the wines artificially infested with ladybird beetles (white wine from 2009 and 2010, and red wines from 2009) and the wines spiked with

synthetic pyrazines (see above) in order to identify the special taste caused by methoxypyrazines or live beetles. The wines, presented in standard wine tasting glasses, were evaluated with the three-alternative forced choice (3-AFC) test in March 2010 and 2011 in the sensory evaluation room at Geilweilerhof, Siebeldingen under daylight conditions. Between the wine sets panelists were able to drink water and eat bread to neutralize the taste. Labeling of the uncovered glasses was done by numerical sets. The panelists were trained before the session with labeled control wine and labeled wine infested with the maximum number of beetles·kg⁻¹ of grapes or the maximum amount of synthetic IPMP·L⁻¹ in the trials. When 50 % of panel individuals had identified the altered taste, it was defined as sensory detection threshold (SDT; after definition of Bi and ENNIS 1998). It could be read from the diagram at the point the quadratic function curve crosses the 50 %-threshold line.

Results

Beetle mortality as a function of pressure: An increase in pressure increased the mortality of *H. axyridis*. A pressure of 2 bar caused a mortality of 50 % (SD 5.6 %) of beetles. A reduction under 2 bar was not effective in reducing the mortality (still 50 %). At 3 bar, beetles were heavily crushed and the mortality increased to 60 %, at 4 bar 75 %. A maximum pressure of 5 bar resulted in 92 % (SD 5.8 %) mortality of the ladybird beetles (Fig. 1). The five-fold repetition showed that the pressing procedure in relation to the mortality of beetles was nearly constant (Fig. 1).

Beetle mortality as a function of pressing duration: A shorter pressing period reduced the mortality of beetles. It was 33 % after the first 30 min of the pressing and only a few beetles got crushed. After 60 min, the mortality of the beetles increased to 70 % and after 90 min the mortality rate was 96 % (Fig. 2). The trend shows a linear relation between mortality of beetles and pressing duration.

Sensory detection threshold (SDT) of 'Riesling' grapes spiked with different numbers of beetles: The SDT of LBT in 'Riesling' wines from 2009 and 2010 was similar. 6 beetles·kg⁻¹

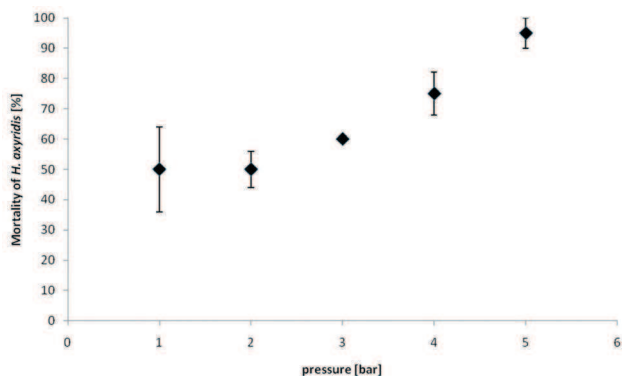


Fig. 1: Beetle mortality [%] in a pneumatic press at different pressures [1-5 bar]. 5 kg grapes were pressed for 15 min. The means and standard deviations (n = 5) are given.

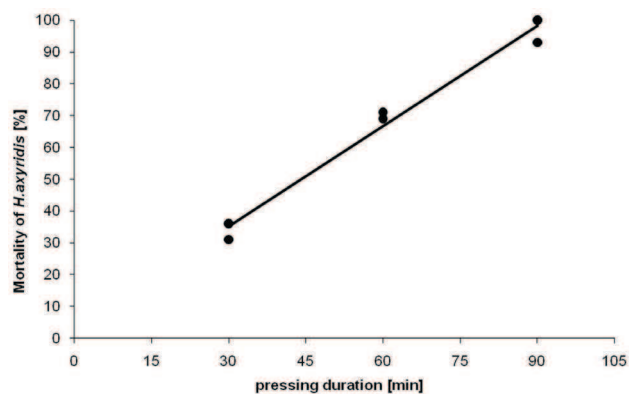


Fig. 2: Beetle mortality [%] after 30, 60 and 90 min in a pneumatic press at 2 bar in a two-fold repetition. Grapes and beetles were mixed every 30 min. A trend line is given.

of grapes were detected by 72 % of test individuals, while only 21 % detected 1 beetle/kg (trial 2009). In 2010 the LBT caused by 1 beetle·kg⁻¹ of grapes was detected by 38 % of panelists. 52 % could detect 5 beetles·kg⁻¹, 89 % could detect 10 beetles·kg⁻¹ and 100 % detected 20 beetles·kg⁻¹ (Fig. 3). The mean of both years resulted in a SDT of LBT at 4 beetles·kg⁻¹.

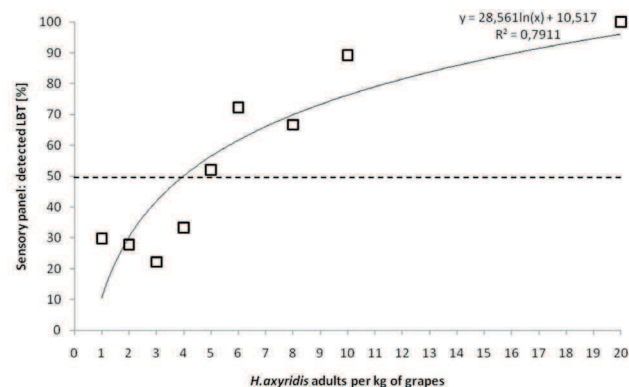


Fig. 3: Percentage of members of a sensory panel who detected "ladybird taint" (LBT) in 'Riesling' infested with different numbers of *H. axyridis* per kg of grapes in the years 2009 and 2010 (average of both years). The sensory detection threshold line is set at 50 %.

SDT of 'Pinot Noir' grapes infested with different numbers of beetles: The SDT of LBT in must fermented 'Pinot Noir' was lower in comparison to must heated wines using the same numbers of beetles per kg of grapes. This means that 3 beetles·kg⁻¹ of grapes were detected by 50 % of panelists in must fermented wines. This threshold increased to 6 beetles·kg⁻¹ of grapes when the grapes were must heated. The upper limit was also different: the must fermented wines infested with 10 beetles·kg⁻¹ of grapes were detected by nearly 100 % of panel persons. Only 70 % of panel individuals detected LBT in must heated wines infested with same number of beetles (Fig. 4).

SDT of synthetic pyrazine in 'Riesling' and 'Pinot Noir' wine: The SDT of the synthetic methoxypyrazine IPMP determined for 'Riesling' was lower than for 'Pinot Noir'. In 'Pinot noir', 58 % of the panelists detected 2 ng IPMP·L⁻¹, while 51 % detected

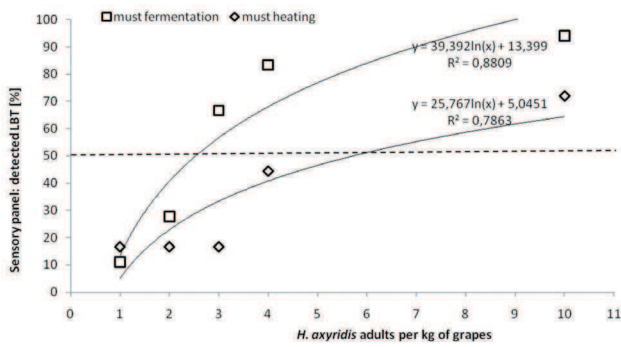


Fig. 4: Detected LBT in 'Pinot Noir' infested with different numbers of *H. axyridis* beetles per kg of grapes under different fermentation conditions (must heating vs. must fermentation). The sensory detection threshold line is set at 50 %.

as little as 1 ng IPMP·L⁻¹ in 'Riesling'. 11 ng IPMP·L⁻¹ or more were detected by all panelist in both varieties. 100 % detected already 3 ng IPMP·L⁻¹ in 'Riesling'. 1 ng IPMP·L⁻¹ in 'Riesling' was only detected by 10 % of panel persons (Fig. 5).

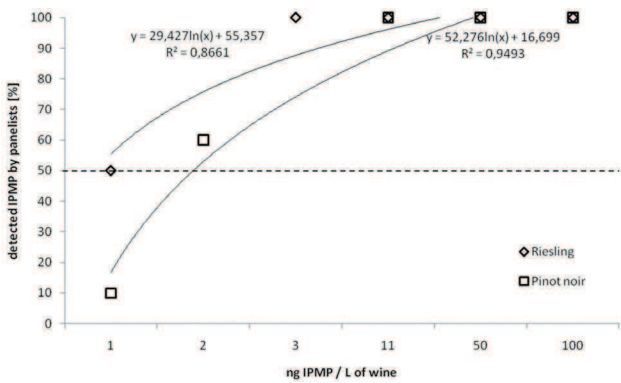


Fig. 5: Concentrations (1, 2, 11, 3, 50 and 100 ng·L⁻¹) of synthetic 2-isopropyl-3-methoxy pyrazine (IPMP) in wine cultivars 'Riesling' and 'Pinot noir' detected by panelists [%]. The sensory detection threshold line is set at 50 %.

Discussion

Reducing the LBT by reducing the mortality of ladybird beetles: Crushing of ladybird beetles resulted in higher amounts of hemolymph in the must, while reflex bleeding alone does not affect LBT in a detectable way (PICKERING *et al.* 2004, GALVAN *et al.* 2007). Therefore, it is desirable that *H. axyridis* beetles do not get crushed during wine processing. Between 1 and 2 bar, no difference in mortality could be detected, but the number of crushed beetles increased at pressures higher than 2 bar. Additionally, pressing durations shorter than 60 min at 2 bar reduced the mortality of the beetles (Fig. 2). Pressing related damage may thus be responsible for their death and loss of hemolymph. The beetles may survive the pressing procedure for some time by hiding themselves interstitially between berries and stems.

Older wine presses like pipe presses and screw presses reaching pressures higher than 3 bar are rarer in big wineries. Modern wine presses like pneumatic presses reach only 1-2 bar. Lower pressures reduce tannin contents but also enable high must volume. The pressing duration is the second important point to optimize pressing procedures. Short time pressing is preferable in order to reach high must profits which increase economic efficiency and fast vintage. The average pressing duration for modern presses is mostly about 90 min. The aim of new pneumatic presses is a reduction of pressing power and duration – which coincides with the aim to reduce the amount of hemolymph of ladybird beetles in must.

After careful consideration of common wine processing conditions and the resulting mortality of beetles, it can be concluded that grapes highly infested with *H. axyridis* should be processed at very low pressure and over a short time with regard to grape quality. In order to obtain good wine tastes a reduction of must yield might be reasonable.

Sensory detection threshold (SDT) of LBT (number of beetles/kg of grapes or ng IPMP·l⁻¹ wine, respectively) in 'Riesling' and 'Pinot Noir': For both the white wine variety 'Riesling' and the red wine variety 'Pinot Noir' (processed with must heating), the SDT was determined to be at 4 respective 6 beetles·kg⁻¹ of grapes, as this number was detected by 50 % of the panel individuals (Fig. 4). In variants with 1-4 beetles·kg⁻¹ of grapes, the LBT was more readily detected in 'Pinot noir' than in 'Riesling'. The SDT of LBT in 'Riesling' in this study is higher than the SDT of 'Riesling' extrapolated from data published by PICKERING *et al.* (2007 b). This might be due to a methodological difference between the studies as PICKERING *et al.* (2007 b) analyzed wine spiked with 3 beetles·kg⁻¹ of grapes and diluted it in different amounts in a control-wine without beetles. As 75 % of panellists detected the blend 51:49 LBT-wine:control wine, PICKERING *et al.* (2007 b) calculated that 51 % of three beetles refer to 1.53 beetles·kg⁻¹ of grapes. Our trials were carried out with beetles starved for one week prior to pressing procedure and a pressure of 5 bar. These facts may influence the SDT. For analysis of the red wine variety 'Red Bergamais' the same method was used with a second important difference between the studies, namely that the beetles were added to grape juice concentrate and not to the grapes. The extrapolated SDT resulted in 1.26 beetles·kg⁻¹ of grapes. PICKERING *et al.* (2007) themselves cautioned that the estimated tolerance level for red wine could be less robust than for white wine because of different trial designs. But the data match the results of GALVAN *et al.* (2007), who estimated that the STD (50 % of panelists) was about 5 beetles·kg⁻¹ of grapes. LINDER *et al.* (2009) confirmed these data for 'Chasselas' and 'Pinot noir' grape varieties.

The difference between our data and the SDT in 'Red Bergamais' calculated by PICKERING *et al.* (2007 b) could mainly be explained by the differing trial design: their wine was prepared by adding live beetles into a grape juice concentrate and not into the grapes before pressing, as seen in their trial design for 'Riesling' and in the presented study.

Thus, the SDT was only estimated by correlating the weight of grapes required to produce the grape juice concentrate with the number of *H. axyridis*/kg of grapes (PICKERING *et al.* 2007 b). This should result in a higher SDT because the beetles were not crushed. Evidently, at a given pressure the SDT of LBT apparently depends on the number of beetles·kg⁻¹ of grapes. A saturation curve is imaginable, indicating that the saturation is reached at an amount of maximum 20 beetles/kg of grapes (Figs 3 and 4).

Many studies describe 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazine (IPMP) as main component causing LBT in wine (overview in KÖGEL *et al.* 2012, PICKERING *et al.* 2005). Therefore, the difference in IPMP intensity was measured and calculated in two wine varieties, too. The sensory intensity of added IPMP in this study was 1 ng·L⁻¹ in 'Pinot noir', and 2 ng·L⁻¹ in 'Riesling' (Fig. 5). In 'Chardonnay', PICKERING *et al.* (2007 a) obtained group best estimated thresholds at 0.32 ng·L⁻¹, for 'Gewürztraminer' 1.56 ng·L⁻¹, and for a red wine blend at 1.03 ng·L⁻¹ (all only orthonasal). Other studies estimated the threshold at 2 ng·L⁻¹ for red wine (see in SALA *et al.* 2004) and for Sauvignon blanc (ALLEN *et al.* 1991). In two different types of grape juices ('Concord' and 'Niagara'), PICKERING *et al.* (2007 a) detected an orthonasal threshold of IPMP between 0.74 and 1.11 ng·L⁻¹. In water, IPMP can be detected at a threshold of 2 ng·L⁻¹ (MURRAY *et al.* 1970, SALA *et al.* 2005, SEIFERT *et al.* 1970). All these data assume that SDT is influenced by medium and in the case of wine by its style (see also PICKERING *et al.* 2007 a). Finally, IPMP is detectable in all tested media at low levels between 0.32-2 ng·L⁻¹. CAI *et al.* (2007) determined an average IPMP content in the hemolymph of adult *H. axyridis* of 0.16 ng per adult beetle, but the contents varied between the specimens. Provided that from 1 kg of grapes in average 800 ml must could be processed, about 6 beetles·kg⁻¹ of grapes would infest the resulting wine with about 1 ng·L⁻¹ IPMP. This corresponds with the detection threshold for LBT in wine in this study. (Fig. 5).

In 'Pinot noir' wine the LBT was detected when at least 6 beetles had infested 1 kg of grapes, while a concentration of 2 ng·L⁻¹ synthetic IPMP was detectable. These values may correspond when the beetles contain higher IPMP amounts than average. Further explanations for diverging SDTs in different studies might be due to annual differences in grape conditions, or the use of different methods during viticulture and viniculture, e. g. the use of different yeasts (PICKERING *et al.* 2006, 2008b). PICKERING *et al.* (2007a) reported, that detection thresholds for IPMP in grape juices 'Niagara' and 'Concord' were strongly influenced by grape variety, and concluded that the human detection threshold for IPMP in wine could be influenced significantly by wine style and evaluation mode. Grape varieties like 'Cabernet Sauvignon' or 'Sauvignon Blanc' contain pyrazines naturally in odour active amounts without any prior contact to ladybird beetles. In these grape varieties ripening, sun light exposure, irrigation or plantation density also influence methoxy-pyrazine contents (HASHIZUME *et al.* 1999; SALA *et al.* 2004, 2005). Therefore, a very wide range of methoxy-pyrazine levels can be found in grapes (KOTSERIDIS *et al.* 1999). Normally 'Riesling' and 'Pinot Noir' have very lit-

tle pyrazine contents but they can occur in low amounts depending on grape growth conditions. Perhaps 'Pinot Noir' used in this trial had naturally less IPMP content than 'Riesling'. We are currently conducting studies to evaluate several factors which may influence the methoxy-pyrazine contents of *H. axyridis*.

Reducing the LBT by using different types of fermentation: In Central Europe two types of wine processing, the must fermentation and must heating, are commonly used in vinification. Must heating is mainly used for red grapes contaminated with grey mold caused by *Botrytis cinerea*. As compared to other wine growing regions, this approach is mostly used in cool climate viticulture (JAKOB 1980). Must fermentation is the classic way to get the red colour out of grape skin and into must. Common duration of fermentation is between two to 30 d depending on fermentation temperature and deliberate wine style (DIPPEL 2000). We calculated a SDT in must heated 'Pinot Noir' at 6 beetles·kg⁻¹. The SDT in 'Pinot Noir' decreased to 3 beetles·kg⁻¹ when the must had been fermented (Figs 3 and 4).

After one day of maceration, SALA *et al.* (2004) recognized an increase of natural IBMP content in grapes of 'Cabernet sauvignon', but after racking, no further increase was observed. The present results suggest that there was an increase in IPMP during maceration when grapes are infested by *H. axyridis*. This could be due to the high extraction of pyrazines, the probable main compounds responsible for the LBT (PICKERING *et al.* 2005; GALVAN *et al.* 2008), in alcohol. In contrast, the contact to alcohol is very low in the must heated variant. There might be a loss of methoxy-pyrazines by warming in the must-heated experiment and therefore possible volatilization of pyrazines. Therefore, the type of fermentation used in previous studies also plays an important role and may have resulted in the wrong conclusion that red wines generally had lower SDT than white wines. LINDER *et al.* 2009 observed a lower SDT in must fermented red wine 'Pinot noir', than in non-must fermented white wine variety 'Chasselas'. Also PICKERING *et al.* (2007 b) used must-fermentation for the grape juice concentrate of 'Red Bergamais' instead of no must-fermentation for the white wine variant.

Finally we can conclude that the fermentation type influenced the LBT which could be reduced by using the must heating technique instead of must fermentation during vinification. A short-term analysis is necessary which will take into consideration the common harvest and processing conditions with regard to higher economic efficiency and lower LBT.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the "Forschungsring deutscher Weinbau" (FDW). The authors thank the staff of the JKI Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof for support in vinification and wine tasting. We are grateful to M. PAULUS and C. EMMERLING from the Trier University, FB VI Geography Biogeography, for cooperation.

References

- AL ABASSI, S. BIRKETT, M. A.; PETTERSSON, J.; PICKETT, J. A.; WOODCOCK, C. M.; 1998: Ladybird beetle odour identified and found to be responsible for attraction between adults. *Cell. Mol. Life Sci.* **54**, 876-879.
- ALLEN, M. LACEY, M. J.; HARRIS, R. L. N.; BROWN, W. V.; 1991: Contribution of methoxyppyrazines to sauvignon blanc wine aroma. *Am. J. Enol. Vitic.* **42**, 109-112.
- BI, J. A.; ENNIS, D. M.; 1998: A Thurstonian variant of the beta-binomial model for replicated difference tests. *J. Sens. Stud.* **13**, 461-466.
- BLAKE, A. KOTSERIDIS, Y.; BRINDLE, I. D.; INGLIS, D.; SEARS, M.; PICKERING, G. J.; 2009: Effect of Closure and Packaging Type on 3-Alkyl-2-methoxyppyrazines and Other Impact Odorants of Riesling and Cabernet Franc Wines. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 4680-4690.
- CAI, L. S.; KOZIEL, J. A.; O'NEAL, M. E.; 2007: Determination of characteristic odorants from *Harmonia axyridis* beetles using *in vivo* solid-phase microextraction and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry-olfactometry. *J. Chromatography A* **1147**, 66-78.
- DIPPEL, H.; LANGE, C.; LANGE, F.; 2000: Das Weinlexikon. Fischer, Frankfurt am Main.
- GALVAN, T.; BURKNESS, E.; HUTCHISON, W.; 2006: Influence of berry injury on infestations of the multicolored Asian lady beetle in wine grapes. *Plant Health Progr.*, 1-4.
- GALVAN, T. L.; BURKNESS, E. C.; VICKERS, Z.; STENBERG, P.; MANSFIELD, A. K.; HUTCHISON, W. D.; 2007: Sensory-based action threshold for multicolored Asian lady beetle-related taint in winegrapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **58**, 518-22.
- GALVAN, T. L.; KELLS, S.; HUTCHISON, W.; 2008: Determination of 3-alkyl-2-methoxyppyrazines in lady beetle-infested wine by solid-phase microextraction headspace sampling. *J. Agric. Food Chem.* **56**, 1065-1071.
- GROSS, J.; EBEN, A.; MUELLER, I.; WENSING, A.; 2010: A Well Protected Intruder: The effective antimicrobial defense of the Invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *J. Chem Ecol* **36**, 1180-1188.
- HASHIZUME, K.; 1999: Grape maturity and light exposure affect berry methoxyppyrazine concentration. *Am. J. Enol. Vitic.* **50**, 194-198.
- JAKOB, L.; 1980: Taschenbuch der Kellerwirtschaft. Fachverlag Dr. Fraund.
- KLAUSNITZER, B.; KLAUSNITZER, H.; 1997. Marienkäfer, 4 ed. Westarp Wissenschaften.
- KOCH, R.; 2003: The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: A review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *J. of Insect Sci.* **3**, 32.
- KOEGEL, S.; BATHON, H.; GROSS, J.; HOFFMANN, C. HOMMES, M.; 2010: Der asiatische Marienkäfer *Harmonia axyridis* (PALLAS, 1773) – Schädlings oder Nützling. Informationsblatt des JKI.
- KOEGEL, S.; HOFFMANN, C.; GROSS, J.; ULRICH D.; 2012: Diversity and frequencies of methoxyppyrazines in hemolymph of *Harmonia axyridis* and *Coccinella septempunctata* and their influence on the taste of wine. *Eur. Food Res. Technol.* **1**, in press.
- KOTSERIDIS, Y.; ANOCIBAR BELOQUI, A.; BAYONOVE, C. L.; BAUMES, R. L.; BERTRAND, A.; 1999: Effects of selected viticultural and enological factors on levels of 2-methoxy-3-isobutylpyrazine in wines. *J. Int. Sci. Vigne Vin* **33**, 19-23.
- LINDER, C.; LORENZINI, F.; KEHRLI, P.; 2009: Potential impact of processed *Harmonia axyridis* on the taste of 'Chasselas' and 'Pinot noir' wines. *Vitis* **48**, 101-102.
- MURRAY, K.; SHIPTON, J.; WHITFIELD, F.B.; 1970: 2-methoxyppyrazines and flavour of green peas (*Pisum sativum*). *Chem. Ind-London* **27**, 897.
- PICKERING, G. J.; LIN, J.; RIESEN, R.; REYNOLDS, A.; BRINDLE, I.; SOLEAS, G.; 2004: Influence of *Harmonia axyridis* on the sensory properties of white and red wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **55**, 153-159.
- PICKERING, G. J.; LIN, Y.; REYNOLDS, A.; SOLEAS, G.; RIESEN, R.; BRINDLE, I.; 2005: The influence of *Harmonia axyridis* on wine composition and aging. *J. Food Sci.* **70**, 128-135.
- PICKERING, G. J.; LIN, J.; REYNOLDS, A.; SOLEAS, G.; RIESEN, R.; 2006: The evaluation of remedial treatments for wine affected by *Harmonia axyridis*. *Int. J. Food Sci. Technol.* **41**, 77-86.
- PICKERING, G. J.; KARTHIC, A.; INGLIS, D.; SEARS, M.; KER, K.; 2007 a: Determination of ortho- and retronasal detection thresholds for 2-isopropyl-3-methoxyppyrazine in wine. *J. Food Sci.* **72**, 468-472.
- PICKERING, G. J.; KER, K.; SOLEAS, G.; 2007 b: Determination of the critical stages of processing and tolerance limits for *Harmonia axyridis* for "ladybug taint" in wine. *Vitis* **46**, 85-90.
- PICKERING, G. J.; SPINK, M.; KOTSERIDIS, Y.; BRINDLE, I.; SEARS, M.; INGLIS, D.; 2008 a: Morbidity of *Harmonia axyridis* mediates ladybug taint in red wine. *J. Food Agric. Environ.* **6**, 133-7.
- PICKERING, G. J.; SPINK, M.; KOTSERIDIS, Y.; INGLIS, D.; BRINDLE, I.; SEARS, M.; BEH, A.; 2008 b: Yeast strain affects 3-isopropyl-2-methoxyppyrazine concentration and sensory profile in Cabernet Sauvignon wine. *Aust J. Grape Wine Res.* **14**, 230-237.
- PICKERING, G. J.; BLAKE, A.; KOTSERIDIS, Y.; 2009: Effect of closure, packaging and storage conditions on impact odorants of wine. *Czech J. Food Sci.* **27**, 62-65.
- PICKERING, G. J.; BLAKE, A. J.; SOLEAS, G. J.; INGLIS, D. L.; 2010: Remediation of wine with elevated concentrations of 3-alkyl-2-methoxyppyrazines using cork and synthetic closures. *J. Food Agric. Environ.* **8**, 97-101.
- ROSS, C. F.; ROSALES, M. U.; FERNANDEZ-PLOTKA, V. C.; 2010: Aroma profile of Niagara grape juice contaminated with multicoloured Asian lady beetle taint using gas chromatography/mass spectrometry/olfactometry. *Int. J. Food Sci. Technol.* **45**, 789-793.
- SALA, C.; BUSTO, O.; GUASCH, J.; ZAMORA, F.; 2004: Influence of vine training and sunlight exposure on the 3-alkyl-2-methoxyppyrazines content in musts and wines from the *Vitis vinifera* variety Cabernet Sauvignon. *J. Agric. Food Chem* **52**, 3492-3497.
- SALA, C.; BUSTO, O.; GUASCH, J.; ZAMORA, F.; 2005: Contents of 3-alkyl-2-methoxyppyrazines in musts and wines from *Vitis vinifera* variety Cabernet Sauvignon: influence of irrigation and plantation density. *J. Sci. Food Agric.* **85**, 1131-1136.
- SEIFERT, R.; BUTTERY, R. G.; GUADAGNI, D. G.; BLACK, D. R.; HARRIS, J. G.; 1970: Synthesis of some 2-methoxy-3-alkylpyrazines with strong bell pepper like odors. *J. Agric. Food Chem.* **18**, 246.

Received July 22, 2011

Diversity and frequencies of methoxypyrazines in hemolymph of *Harmonia axyridis* and *Coccinella septempunctata* and their influence on the taste of wine

Susanne Kögel · Jürgen Gross · Christoph Hoffmann · Detlef Ulrich

Received: 15 September 2011 / Revised: 22 November 2011 / Accepted: 26 November 2011 / Published online: 17 December 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract The study focuses on the odor-active intensity and occurrence of three methoxypyrazines in ladybird beetles, *Harmonia axyridis*, invasive in Europe and the USA, and *Coccinella septempunctata*, native in Europe, but invasive in the USA. It is known from previous studies that *H. axyridis* has negatively influenced the taste of wine in the USA because of releasing their hemolymph in must during harvesting. In relation to *C. septempunctata*, *H. axyridis* had more nitrogen containing compounds in its hemolymph and 2-isopropyl-3-methoxypyrazine (IPMP) and mainly 2-sec-buthyl-3-methoxypyrazine (SBMP) in higher amounts. The compound IPMP was detected as the main odor-active compound in both ladybird beetle species. Wines infested with hemolymph of *C. septempunctata* were more readily detected as altered wine with a ‘ladybird taint’ than wines infested with *H. axyridis*. 2-isobuthyl-3-methoxypyrazine (IBMP) could be identified as second intensive odor-active compound of *C. septempunctata*, which occurred in a much lower frequency in *H. axyridis*. SBMP, the second highest measured *N*-compound of *H. axyridis*, had a lower olfactory

active threshold in gas chromatography–olfactometry test. *C. septempunctata* contained less SBMP in its hemolymph than *H. axyridis*. This study objected that besides *H. axyridis* also *C. septempunctata* can influence the taste of wine in a detectable way.

Keywords IPMP · SBMP · IBMP · Ladybird taint · Gaschromatography

Introduction

The seven-spot ladybird beetle *Coccinella septempunctata* (Linné 1758) is native to Europe but invasive in the USA. The Multicolored Asian Ladybird beetle *Harmonia axyridis* (Pallas 1773) is an invasive species in both countries. It was introduced to North America and Central Europe as a biological control agent. To increase their chances of survival during winter time, some carnivorous ladybird beetles, especially *H. axyridis*, feed on sugar-containing grapes in late autumn. This feeding behavior decreased their mortality compared to beetles without fruit feeding [1].

After the establishment of *H. axyridis* in the USA, altered wines had occurred. In 2001, US winegrowers suffered from big economic losses after processing millions of beetles with the grapes [2]. When *H. axyridis* feeds on grapes, it is possible that it will be harvested with the fruits, especially when using mechanical harvest. During processing, the beetles release their hemolymph in the must by reflex bleeding or getting crushed. The hemolymph of ladybird beetles contains several methoxypyrazines [3]. It is known that these chemical compounds are responsible for a specific alteration of the smell and taste of wine called ‘ladybird taint’ (LBT), which was described firstly from *H. axyridis* [4, 5]. Until now, the major compounds

S. Kögel (✉) · C. Hoffmann

Julius Kühn-Institut, Federal Research Center for Cultivated Plants, Institute for Plant Protection in Fruit Crops and Viticulture, Geilweilerhof, 76833 Siebeldingen, Germany
e-mail: susanne.koegel@jki.bund.de

J. Gross

Julius Kühn-Institut, Federal Research Center for Cultivated Plants, Institute for Plant Protection in Fruit Crops and Viticulture, Schwabenheimer Str. 101, 69221 Dossenheim, Germany

D. Ulrich

Julius Kühn-Institut, Federal Research Center for Cultivated Plants, Institute for Ecological Chemistry, Plant Analysis and Stored Product Protection, Erwin-Baur-Str. 27, 06484 Quedlinburg, Germany

responsible for LBT are not completely identified. A study describes 2-isopropyl-3-methoxypyrazine (IPMP) as main olfactory active component causing the off-flavor [6]. In contrast, in a more recent study, 2-sec-butyl-3-methoxypyrazine (SBMP) was identified therefore [7].

Ladybird beetles are generally welcome in the landscape because they feed on pest insects and reduce aphids also around vineyards [8]. But in the 1970s–1980s, the wine quality in German wine-growing regions suffered also from a contamination with chemical compounds from *C. septempunctata*, which at that time was not yet considered as a possible hazard (RAPP, personal communication).

Cudjoe et al. [9] found that *H. axyridis* contains a hundredfold higher quantity of IPMP in its hemolymph than *C. septempunctata*. Therefore, it was expected that the risk potential of *C. septempunctata* to deteriorate wine quality is lower than that of *H. axyridis*. Up to now it is unknown whether there is a difference in the sensory perception of LBT influenced by both species, even though three pyrazine compounds (IPMP, SBMP and 2-isobutyl-3-methoxypyrazine (IBMP) were detected in its hemolymph [9, 10].

In this study, the following issues were addressed in three trials: (1) the impact of the two species *H. axyridis* and *C. septempunctata* on the sensory property of wine was investigated. (2) The diversity and frequency of the three pyrazines (IPMP, SBMP and IBMP) in adults of *H. axyridis* and *C. septempunctata* were measured. (3) The three volatile pyrazines were quantified in relation to other volatiles in *H. axyridis* and *C. septempunctata*.

Materials and methods

Insects: Imagines of *H. axyridis* and *C. septempunctata* were reared under controlled conditions in a climate chamber (24 °C, 60% humidity, 16:8 h/L:D) in glass-rearing cages (40 × 30 × 30 cm) at the Julius Kühn-Institut, Dossenheim. The beetles were fed a diet of pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*) raised on beans (*Vicia faba*), pollen (Ullmann, Erlensee, Germany) and water *ad libidum*.

Winemaking

Control wine (trial 1 and 3): 5 kg of grapes (variety ‘Riesling’) in the year 2009 were pressed at 5 bar in a pneumatic press (Fa. Willmes, Lorsch, Type 6030). The resulting must was filled into 5-L-jugs, and sulfur dioxide was added to a concentration of 50 mg/L. Next, the must was inoculated with yeast (Erbslöh Önoferm Freddo, 10 g/100L). After fermentation, again 100 mg/L sulfur dioxide was added, and the wine separated from the yeast and filled into 0.5 L bottles.

Spiked wine (trial 1): 8 beetles/L and 16 beetles/L of either *H. axyridis* or *C. septempunctata* were crushed with 10 mL doubly distilled water in a mortar cup and centrifuged (1 min, 3,000 U/min, Hettich, Tuttlingen). Bottled wines (0.5 L) of control wine (variety Riesling) from 2009 were then inoculated with the supernatant (10 mL) either of the two ladybird species.

Sensory assessment

Wine sensory assessment by discrimination test (trial 1): Panelists were trained prior to session with control wine and wine infested with 20 *H. axyridis* adults/kg of grapes made in an earlier trial design in 2009. The spiked wines were compared to the control wine in sensory sessions using a panel of 10 persons. Every person was asked to evaluate the intensity of the variants “*C. septempunctata*-wine”, “*H. axyridis*-wine” and “control wine” with numbers of 0 for no LBT sensation and 1 (lowest LBT sensation) to 3 (highest LBT sensation). Each variant was tested in a twofold repetition (2 × 0.5 L bottles).

Training for gas chromatography–olfactometry (GC-O) (trial 3): A sensory panel of seven persons was trained prior to the trials in the following way: At first, all persons had to describe the pure substances that consisted of focused pyrazines (IPMP, IBMP and SBMP) in a solution of 10 ng/L on strips in a group session (descriptive sensory). After that every person had to characterize the pure substances (orthonasal) separately under red light conditions in a sensory cabin on their own. The sensory training was repeated three times.

GC-O: The trained people were then invited to the GC-runs with an included olfactory detection port (see below). They had to detect and, if possible, to characterize the smell of all sensation of the extract of *H. axyridis* and *C. septempunctata*. Between the sniffing of the samples, a time lag of 24 h was included in order to regenerate nose perception.

Sample preparation for headspace-SPME-GC-MS

Extract of beetles (trial 3): 50 adults of *H. axyridis* were crushed in 100 mL Milli-Q-water with a mortar in a mortar cup. The solution was centrifugated (3,000 U/min, 1 min, Hettich, Tuttlingen), and the supernatant aliquoted in 10 mL samples into 10 round-bottom vials (20 mL). 3 g of sodium chloride and a magnetic stirring bar were added and each vial closed with gas tight magnetic screwing caps.

Extract of beetles (trial 2): One beetle of each species was put in 10 mL Milli-Q-water and crushed with a mortar in a mortar cup. The experiments were repeated 50 times per species. Before use, the beetles were weighed and their sex determined. The sample was then transferred to a 20 mL

round-bottom glass headspace vial that contained 3 g of sodium chloride and a magnetic stirring bar.

HS-SPME

The volatile compounds were extracted using headspace-solid phase micro-extraction (HS-SPME). The headspace was sampled using a divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane fiber (Sigma AldrichNr. 57328-U) and manual fiber assembly. The sample vial was heated up to 40 °C in a water bath for 20 min before fiber exposure for headspace equilibration. After 30 min of fiber exposure in the sample headspace with a constant temperature of 40 °C and stirring, the fiber was thermally desorbed splitless in a GC injection port at 250 °C for 2 min and further thermally cleaned for 3 min with 10 mL/min split flow.

GC-methods

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS, Agilent, 6890): Volatiles were separated on a DB-Wax column (30 m length, 0.25 mm I.D., 0.50 µm film; J&W Scientific, Santa Clara, CA, USA) by increasing the temperature. The temperature program started at 45 °C, was held for 5 min and then raised by 10 °C/min to 210 °C. The final temperature was held for 15 min. The carrier gas was helium with a flow of 1.1 mL/min. Detection was carried out by flame ionization detector (FID) for 12 min and then switched to MS. For measuring the frequency of methoxypyrazine compounds, MS was set to SIM mode (selected mass channels were *m/z* 137 and 152 for 2-isopropyl-3-methoxypyrazine (IPMP), 124 and 151 for 2-isobutyl-3-methoxypyrazine (IBMP) and 137 and 94 for 2-sec-buthyl-3-methoxypyrazine (SBMP)). For qualification, MS was set to scan mode. Authentic reference substances namely IPMP, IBMP, and SBMP (SIGMA AldrichNr. 297666, Nr. 243132 and Nr. 243116) were analyzed in a water solution at a concentration of 10 ng/L for identification.

GC-O/GC-FID (ODP3, Gerstel, Germany): Volatiles were separated using a DB-Wax column (15 m length, 0.320 mm I.D., 0.50 µm film; J&W Scientific) and helium (2 mL/min) as carrier gas by increasing the temperature after an initial heating at 45 °C (held for 5 min) with a ramp of 10 °C/min to 210 °C. A final step of 210 °C was hold for 15 min. Monitor runs of all samples were first done by GC-FID. Afterwards, the same column was switched to the sniffing port (GC-O).

Gas chromatography-nitrogen phosphor detector (GC-NPD, Agilent 6890): Volatiles were separated by increasing the temperature from 45 °C (held for 5 min); 5 °C/min to 210 °C; 210 C was hold for 15 min. The column was a DB-Wax (30 m length, 0,250 mm I.D., 0.50 µm film J&W Scientific). The carrier gas was helium (1.1 mL/min).

Data processing and statistics

Trial 1: Common for wine tastings the statistical analyses were done using rank sum analysis.

Trial 2+3: Data peaks of GC-MS were integrated with the program ChemStation (D.02.00.611, Agilent Technologies). Peak identification was done by library search (NIST). Peak areas under 100000 counts were set as zero. Because of the natural diversity in the pyrazine pattern, the detection frequency was a reliable indicator instead of individual semiquantitative values.

GC-O and GC-NPD data peaks were integrated with ChemStation software (Rev.B.03.02 [341], Agilent) and resulting peak areas compared between the samples. Analysis of GC-O methods was carried out as described by Grosch and Ulrich [11]. All odors detected by more than two persons were assumed as representative.

Correlation between the different gas-chromatographic instruments

Correlation of retentions times between GC-MS and GC-NPD was done using a reference solution consisting of eight *N*-containing substances and a hydrocarbon. For correlation between GC-MS and GC-O, a so-called boiling point sample in a concentration of 0.001 (v/v) was used.

Results

Impact of the two different species *H. axyridis* and *C. septempunctata* on the sensory properties of wine

The wines that contained *C. septempunctata* were detected as altered wines from more persons than the wines infested with hemolymph of *H. axyridis*. All ten persons of the panel ranked the wines inoculated with hemolymph of *C. septempunctata* to be highly contaminated with ladybird taint (more than 80% of maximum intensity). In both types, the variants with 16 beetles/L wine reached higher values than the variants with 8 beetles/L wine. *H. axyridis*-wines were ranked with 50% of maximum intensity as ladybird-wines. Additionally, it was observed that *C. septempunctata*-inoculated wines were more intense in wine color than those wines containing *H. axyridis* (Fig. 1).

Frequencies of IPMP, IBMP and SBMP in adults of *H. axyridis* and *C. septempunctata* (GC-MS)

IPMP was detectable in the hemolymph of all specimens of both species (100%). The frequency of IBMP in *C. septempunctata* was greater (60%) than in *H. axyridis* and SBMP

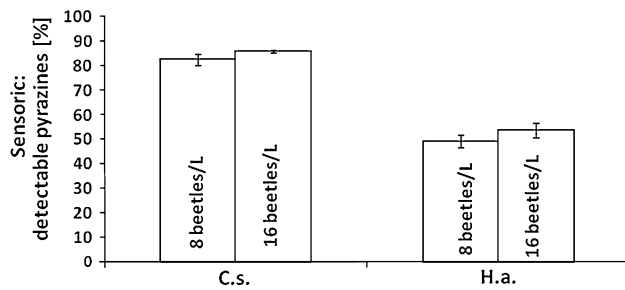


Fig. 1 Rank sum (in % of maximum intensity) of a sensory test of wines with added hemolymph of *C. septempunctata* (C.s.) or *H. axyridis* (H.a.) (8 beetles/L and 16 beetles/L) by 10 panel persons in relation to control wine

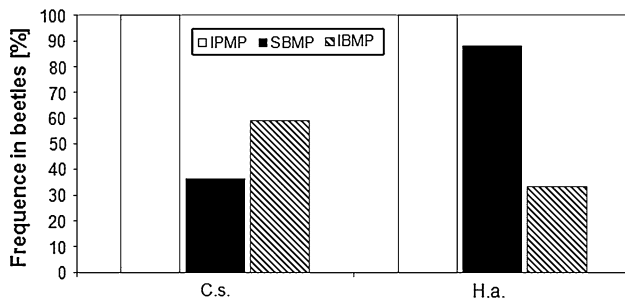


Fig. 2 Frequency (in %) of the pyrazines IPMP, IBMP and SBMP detected by GC-MS (SIM) in beetles of *H. axyridis* (H.a.) and *C. septempunctata* (C.s.) (n = 50 for each species) above GC-area counts of 100 000

was detected in smaller frequency, respectively (36%). *H. axyridis* was characterized by a different pyrazine pattern. SBMP was more often detectable than IBMP, it occurred in 87% of the beetles (Fig. 2).

Identification of pyrazines from *H. axyridis* and *C. septempunctata* (GC-NPD, GC-MS, GC-O)

In total, in the extracts of *H. axyridis* adults 12 *N*-containing peak compounds were detected compared to 11 in *C. septempunctata*. Three peak compounds differed between both species. One peak compound that occurred only in *C. septempunctata* was identified as one of the three focused pyrazines, IBMP. Six peaks detected in *H. axyridis* samples had larger areas than peaks detected in samples of the seven-spot ladybird beetle. In *H. axyridis*, mainly IPMP (RT 20.00 min/18.48 min) and high peaks of SBMP (RT 22.00 min/20.47 min) were detected by GC-MS and GC-NPD. In extracts of *C. septempunctata*, the peaks of IPMP were the highest and the peak area similar to the peak area of IPMP found in *H. axyridis*. SBMP and IBMP had similar but smaller peak areas than IPMP (Fig. 3a, b).

In GC-O-analyses of the same extracts, the panelists detected six odors in *C. septempunctata* and *H. axyridis* (Table 1) with a relation to ladybird taint. IPMP (RT

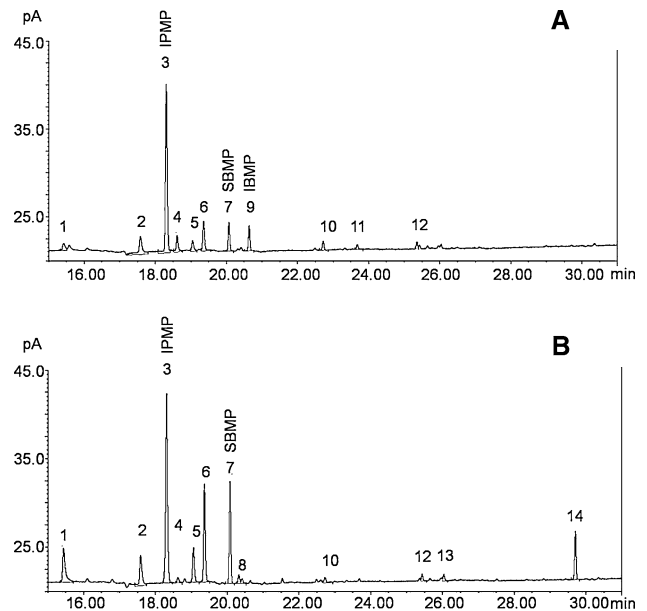


Fig. 3 a, b Chromatograms of extracts of *C. septempunctata* (TIC a) and *H. axyridis* (TIC b) with GC-NPD. IPMP was detected in all variants; SBMP in extract of *C. septempunctata* and *H. axyridis* and IBMP only in extracts of *C. septempunctata*

9.98 min) was clearly detected by all panel individuals in both species in highest strength. In addition, all panelists identified the typical odor of IBMP (cooked potato and green peas) in *C. septempunctata* (RT 11.20 min). In *H. axyridis*, IBMP was only detected by two panelists. A third odor was described from the seven-spot ladybird beetle by 71% of panelists as muffy and green. The other odorants were only smelled by less than four persons and with less strength in nose (Table 1).

Discussion

In agreement with Galvan et al. [4], Linder et al. [12] and Pickering et al. [6], this study detected that *H. axyridis* influences the taste of wine resulting in the so-called ladybird taint (LBT). All panelists recognized this particular flavor in wines supplied with the hemolymph of this invasive species. Interestingly, the same effect was observed in wines contaminated with adults of *C. septempunctata*. It was reported (RAPP, personal communication) that this species had already influenced the taste of German wine in the seventies and eighties. The concentration of 8 and 16 beetles, respectively, per liter of wine was not relevant for the sensory description. Already the smell caused by 8 beetles per L of wine was recognized by nearly all panelists [4, 6, 12]. The saturation when all panelists detect the LBT is reached at about 10 beetles per kg of grapes [13]. The artificial wines contaminated with *C. septempunctata* showed a stronger LBT as compared to *H. axyridis*-contaminated wines. The rank sum of detection was significantly higher.

Table 1 Described odors of compounds emitted by extracts of *H. axyridis* and *C. septempunctata* by panel persons at defined retention times (RT) and retention indices (RIs)

RT	RI	NIF C. s. (%)	NIF H.a. (%)	<i>C. septempunctata</i>	<i>H. axyridis</i>
8.11	1,311	29	57	Fungous	Fungous
9.98	1,445 ^a	100	100	Old potato	Old potato
10.30	1,469	71	29	Muffy, green	Muffy, green
10.96	1,522 ^b	29	29	Potato, herbaceous	Potato, herbaceous
11.20	1,542 ^c	100	29	Cooked potato, green	Green, muffy
13.08	1,708	57	–	Fermented, wet clothes	–
15.02	1,861	–	43	–	Bug, green

NIF Nasal impact frequency (%)

^a IPMP, ^b SBMP, ^c IBMP

This is a surprising result because Cudjoe et al. [9] stated that *H. axyridis* should contain a hundredfold higher amount of IPMP than *C. septempunctata*, and according to Pickering et al. [6], IPMP should be the main olfactory active compound causing this specific off-flavor. In contrast, Ross et al. [7] and Galvan et al. [14] described SBMP as the responsible compound. However, more clarity was expected from the GC-analyses and the measurements of the frequency of the three important pyrazines (IPMP, SBMP and IBMP) as described from Cai et al. [3] and Cudjoe et al. [9] in the two beetle species.

In this study, raw data (peak areas) were used to compare the different contents of pyrazines (so-called relative amounts). The detected peak areas of IPMP were nearly equal in both species. Amounts are expected to vary between seasons, between individuals or in relation to the food (Kögel et al., *submitted.*), but in these beetles, which were reared in laboratory under standardized conditions, differences of IPMP amounts in respect for both species could not be detected. The differences in amounts of IPMP in the two species between Cudjoe et al. [9] and this study might be due to the use of live beetles in our trials, while Cudjoe et al. analyzed frozen beetles. All other measured *N*-compounds in *H. axyridis* had higher peak areas than the same compounds in the seven-spot ladybird beetle—among others SBMP.

In this study, we want to clarify, which of the different pyrazine compounds is responsible for the LBT of both species. Further analysis with GC-O showed differences between the odor-active compounds in hemolymph of the two ladybird beetle species. IPMP was the main odor-active compound, which was detected by all panelists in both species. Cai et al. [3] also showed the highest relative intensity of IPMP in the aromagram from *H. axyridis*. In *C. septempunctata*, IBMP was sniffable by all panelists instead of only few who detected this compound in the Multicolored Asian Ladybird beetle. Although SBMP in *H. axyridis* could be measured with high GC-area counts by GC-MS and GC-NPD, it could not be detected with the sniffing port

in high amounts. We agree with Galvan et al. [14] and Ross et al. [7] that SBMP is a compound in musts or wine caused by *H. axyridis*. But as shown in this study, this compound was less odor-active than IBMP and IPMP. A earlier study describe that SBMP in a water solution could be detected by the human nose at nearly equal amounts than IBMP [15]. Therefore, these results are in contrast to that previous study. Water matrices [14], grape juice-matrices [7] and hemolymph matrices (this study) might have an influence on sensory characters and might explain the differences of odor-activity. IBMP is the main olfactory active compound in wines such as Cabernet sauvignon or Sauvignon blanc. These varieties have similar tastes of asparagus or green bell pepper as was described from LBT [5]. *C. septempunctata* especially had this typical smell of IBMP in its hemolymph. Comparison between all peaks of GC-O in both hemolymph types showed more odors in *C. septempunctata* than in *H. axyridis*.

Using GC-MS analyses, this study has been able to underline the olfactory results of hemolymph extracts of beetles: Cudjoe et al. [9] identified more SBMP in *H. axyridis* than in *C. septempunctata*, where it was not found at all. In this study, peaks of SBMP in the seven-spot ladybird beetle were found, but less frequently. IBMP was more apparent in chromatograms of *C. septempunctata* than in *H. axyridis*. IPMP was detectable in every individual of both species.

These results underline the GC-O-derived data above and it could be demonstrated that in the case of olfactory pyrazine compounds, *H. axyridis* is not more hazardous in relation to wine taste than *C. septempunctata*. IPMP dominates in amount and in its odor-active strength; IBMP was another compound, second to IPMP, emitted in high amounts, but only from hemolymph of *C. septempunctata*. Further studies are necessary to determine the influence of factors like stress, food or annual seasons on the relation between pyrazine compounds in the beetles. All beetles used in the trials were reared in a climate chamber under constant conditions. Modification in temperature or day-length

may also influence the amount of pyrazine compounds and their pattern. As described from Al Abassi et al. [10], IPMP plays not only a role as an alerting signal for predators but also as an aggregation pheromone. A dual function might be possible for IBMP and SBMP too.

Although *C. septempunctata* showed similar IPMP peak areas like *H. axyridis* and contained a second intensive odor compound (IBMP), its risk potential for winegrowers might be lower. The population densities of *H. axyridis* in late summer are often much higher than of *C. septempunctata*. Its life span is only one year instead of possible three years for *H. axyridis* [16] and it has normally only one generation per year compared to four generations produced by *H. axyridis* [17]. Additionally, the Multicolored Asian Ladybird beetle is much better protected against pathogenic microorganisms [18]. *C. septempunctata* is native to Europe, while *H. axyridis* is invasive. Thus, specific predators for *H. axyridis* are rare or absent. For further insight of risk potential, additional field studies on the biology and ecology of the two species are necessary.

Acknowledgments This work was supported by a grant from the ‘Forschungsring deutscher Weinbau’ (FDW). The authors thank the staff of JKI Grape-breeding Institut for support in vinification and wine tasting and the staff of JKI EPS Quedlinburg for sniffing. We thank Svenja Hoferer and Sabine Wetzel (JKI Dossenheim) for rearing the beetles. We are grateful to M. Paulus and C. Emmerling from the Trier University, Faculty VI, (Germany) for cooperation.

References

- Galvan T, Koch R, Hutchison WD (2008) Impact of fruit feeding on overwintering survival of the multicolored Asian lady beetle, and the ability of this insect and paper wasps to injure wine grape berries. *Entomol Exp Appl* 128:429–436
- Riesen R (2008) Der asiatische Marienkäfer im Weinbau. *Schweiz Z Obst-Weinbau* 22:10–12
- Cai LS, Koziel JA, O’Neal ME (2007) Determination of characteristic odorants from *Harmonia axyridis* beetles using in vivo solid-phase microextraction and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry-olfactometry. *J Chromatogr A* 1147:66–78
- Galvan TL, Burkness EC, Vickers Z, Stenberg P, Mansfield AK, Hutchison WD (2007) Sensory-based action threshold for multicolored Asian lady beetle-related taint in winegrapes. *Am J Enol Viticult* 58:518–522
- Pickering G, Lin J, Riesen R, Reynolds A, Brindle I, Soleas G (2004) Influence of *Harmonia axyridis* on the sensory properties of white and red wine. *Am J Enol Viticult* 55:153–159
- Pickering G, Ker K, Soleas G (2007) Determination of the critical stages of processing and tolerance limits for *Harmonia axyridis* for ‘ladybug taint’ in wine. *Vitis* 46:85–90
- Ross CF, Rosales MU, Fernandez-Plotka VC (2010) Aroma profile of Niagara grape juice contaminated with multicoloured Asian lady beetle taint using gas chromatography/mass spectrometry/olfactometry. *Intl J Food Sci Tech* 45:789–793
- Mohr HD (2005) Farbatlas Krankheiten, Schädlinge und Nützlinge an der Weinrebe. Eugen Ulmer KG
- Cudjoe E, Wiederkehr TB, Brindle ID (2005) Headspace gas chromatography-mass spectrometry: a fast approach to the identification and determination of 2-alkyl-3-methoxypyrazine pheromones in ladybugs. *Analyst* 130:152–155
- Al Abassi S, Birkett MA, Pettersson J, Pickett JA, Woodcock CM (1998) Ladybird beetle odour identified and found to be responsible for attraction between adults. *Cell Mol Life Sci* 54:876–879
- Ullrich W, Grosch W (1987) Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid. *Z Lebensm Unters Forsch* 184:277–282
- Linder C, Lorenzini F, Kehrli P (2009) Potential impact of processed *Harmonia axyridis* on the taste of ‘Chasselas’ and ‘Pinot noir’ wines. *Vitis* 48:101–102
- Kögel S, Gross J, Hoffmann C (2012) Sensory detection thresholds of ‘ladybird taint’ in ‘Riesling’ and ‘Pinot noir’ under different fermentation and processing conditions. *Vitis* (in press)
- Galvan TL, Kells S, Hutchison WD (2008) Determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in lady beetle-infested wine by solid-phase microextraction headspace sampling. *J Agric Food Chem* 56:1065–1071
- Sala C, Mestres M, Marti MP, Busto O, Guasch J (2002) Headspace solid-phase microextraction analysis of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wines. *J Chromatogr A* 953:1–6
- Savoiskaya GI (1970) Introduction and acclimatisation of some coccinellids in the Alma-Ata reserve. *Trudy Alma Atinskogo Gosudarstvennogo Zapovednika* 9:138–162 cited from Koch RL 2003
- Koch R (2003) The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: A review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *J Insect Sci* 3:1–16
- Gross J, Eben A, Mueller I, Wensing A (2010) A well protected intruder: the effective antimicrobial defense of the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *J Chem Ecol* 36:1180–1188

Influence of Diet on Fecundity, Immune Defense and Content of 2-Isopropyl-3-Methoxypyrazine in *Harmonia axyridis* Pallas

Susanne Kögel · Astrid Eben · Christoph Hoffmann · Jürgen Gross

Received: 8 February 2012 / Revised: 19 April 2012 / Accepted: 10 May 2012 / Published online: 31 May 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract Food type can affect all functional aspects of an insect's life. We investigated the effects of different diet regimes on life history parameters of the ladybird beetle *Harmonia axyridis*. Furthermore, we tested the importance of elytral color, sex, and diet on chemical and immune defense in this species. We also compared hemolymph from cohorts of *H. axyridis* and *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) fed different diets to examine effects on the 2-isopropyl-3-methoxypyrazine (IPMP) content in these beetles. No effects of diet on the duration of larval development and on adult weight were found. We detected, however, significantly higher fecundity and oviposition rates when female *H. axyridis* were reared on pea aphids than when reared on eggs of *Ephestia kuehniella*. Males and females did not differ in their immune response. Elytral color affected both immune defense and chemical defense. The antimicrobial activity of the hemolymph differed only when morphotypes were tested against *E. coli*. Moreover, we observed an effect of elytral pigmentation on IPMP content. The *succinea* 2 type (orange without dots) had the lowest IPMP content in two out of three feeding regimes compared to the *succinea* 1 (orange with dots) type. Depending on diet, IPMP contents differed in both species leading to higher contents either in *H. axyridis* or *C. septempunctata*. Furthermore, aphid species ingested during larval

development significantly affected IPMP content in adult beetles. These results implicate new aspects for risk assessment of *H. axyridis* in viticulture.

Keywords IPMP · Elytral color · *Acyrtosiphon pisum* · Aphids · *Coccinella septempunctata* · *Ephestia kuehniella* · Immune system · MIC tests · Coleoptera · Viticulture · Insect pathogen · Wine · Antimicrobial

Introduction

Ladybird beetles (Coleoptera: Coccinellidae) have a broad prey range that includes aphids, psyllids, scale insects, lepidopteran eggs, and chrysomelids (Hodek and Honek, 1996). At high densities, when prey is scarce or of poor quality, cannibalism is common for some species (Osawa, 1993; Snyder et al., 2000). Diet has, nevertheless, a significant impact on the performance of coccinellids (Specty et al., 2003; Lanzoni et al., 2004, Soares et al., 2005; Berkvens et al., 2008; Jalali et al., 2009). Despite their polyphagy, coccinellids often are specific with regard to their essential food (Hodek, 1993). The aphid species preyed upon and the plant species on which these prey aphids feed can affect larval developmental time, adult longevity, body weight, and fecundity (Hukusima and Kamei, 1970; Fukunaga and Akimoto, 2007).

The Multicolored Asian ladybird beetle, *Harmonia axyridis*, is native to northeast Asia. It has been introduced to different regions of the world (i.e., France or USA) as a biocontrol agent (Tedders and Schaefer, 1994; Ferran et al., 1996) and became widely established in Europe and America (Koch, 2003). In the fall and prior to hibernation, it feeds on sugar-containing fruits, especially grapes (Galvan et al., 2008). In contrast, the seven-spot ladybird beetle *Coccinella*

S. Kögel · C. Hoffmann

Julius Kühn-Institut, Federal Research Center for Cultivated Plants, Institute for Plant Protection in Fruit Crops and Viticulture, Geilweilerhof, 76833 Siebeldingen, Germany

A. Eben · J. Gross (✉)

Julius Kühn-Institut, Federal Research Center for Cultivated Plants, Institute for Plant Protection in Fruit Crops and Viticulture, Schwabenheimer Str. 101, 69221 Dossenheim, Germany
e-mail: juergen.gross@jki.bund.de

septempunctata, a coccinellid beetle native to Europe and invasive to the USA, is a more aphid-specific predator (Hodek and Honek, 1996).

Harmonia axyridis is a polymorphic species, and some phenotypes differ in their fitness. The variable pigmentation of the elytra in *H. axyridis* results in more than 100 recognizable color morphs (Soares et al., 2003). Phenotypes can be divided into five groups: non-melanic *succinea* (red with 0–19 black dots), melanic *conspicua* (black with two red dots), *spectabilis* (black with four red dots), *axyridis* (more than four red dots), and entirely black *nigra* morphs (Soares et al., 2001). This striking feature has led to a number of studies that have examined differences in mating and predatory behavior (Osawa and Nishida, 1992; Seo et al., 2008; Su et al., 2009; Sloggett, 2010) and physiology (Soares et al., 2001, 2005; Bezzerides et al., 2007; Berkvens et al., 2008) for the different phenotypes of this coccinellid species. Moreover, a positive relationship of elytral redness with the content of an alkaloid defense compound (harmaline) in the beetles was reported by Bezzerides et al. (2007). Contrary to chemical defense against predators and parasitoids, immune defense in Coleoptera has received less attention (Bulet et al., 1991; Gross et al., 2008; Haine et al., 2008). Armitage et al. (2003) found no evidence for cuticular melanin content and costs of immune defense in meal worm beetles (Tenebrionidae). For other insects, namely Lepidoptera, some studies have shown a correlation between the amount of cuticle melanization and immune function, while others have reported a lack of such correlation (Wilson et al., 2001; Lee et al., 2008; Karl et al., 2010). To date, no study has related elytral color to immune defense in *H. axyridis*.

The hemolymph of coccinellid beetles contains defensive substances against natural enemies (Klausnitzer and Klausnitzer, 1997). Additionally, some of these substances may act as aggregation pheromones (Al Abassi et al., 1998) or belong to the beetle's immune system. For *H. axyridis*, Gross et al. (2010) observed stronger antimicrobial activity in their hemolymph than in *C. septempunctata*. The main defensive chemicals identified in the hemolymph of *H. axyridis* and *C. septempunctata* are methoxypyrazines (and therein mainly 2-isopropyl-3-methoxypyrazine (IPMP)) (Al Abassi et al., 1998; Pickering et al., 2004; Cai et al., 2007; Kögel et al., 2012b). During grape harvesting and processing, beetles often get crushed or reflex bleed. This causes a specific off-flavor in wine called "ladybird taint" (Pickering et al., 2004, 2005; Galvan et al., 2007; Ross et al., 2010; Kögel et al., 2012a). The influence of food on chemical defense compounds in coccinellid beetles' hemolymph is currently unknown. Thus, this study examined the effect of diet on the content of 2-isopropyl-3-methoxypyrazine and antimicrobial compounds in the hemolymph of *H. axyridis* and *C. septempunctata*.

The performance and IPMP content of *H. axyridis* and *C. septempunctata* fed on eggs of *Ephestia kuehniella* were compared to beetles reared on pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*). For this purpose, we evaluated different fitness parameters between the beetles fed on either of the two diets in the laboratory according to Gross et al. (2004a). Additionally, we investigated the influence of several other aphid species for *H. axyridis* on IPMP content in the wild. Finally, we controlled for correlation of elytral pigmentation and antimicrobial activity in the hemolymph of *H. axyridis* by comparing the phenotypes prevailing in our laboratory colony against three different model microorganisms and an insect pathogen.

Methods and Materials

Insects Permanent laboratory colonies of *H. axyridis* and *C. septempunctata* were maintained under controlled conditions (alternating temperature regime during one week (168 h): 100 h at 25°C, 68 h at 20°C; 16:8 hL/D, 60 % rh) in a climate chamber at the Julius Kühn-Institute (JKI), Dossenheim, Germany. Groups of about 100 larvae were kept either (1) on a diet of pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*) that were reared on beans (*Vicia faba*, tannin reduced cultivar "Tattoo"), (2) on *A. pisum* and grape juice, or (3) on frozen eggs of meal moths (*Ephestia kuehniella*, provided by Koppert Biological Systems, The Netherlands) until pupation. All cohorts received water by soaked cotton pads *ad libitum*. In rearing dishes (50×40×12 cm), the larvae were kept from egg hatching until pupation. Mortality, developmental time, and numbers of pupae were recorded daily. After emergence, the newly hatched adults were sexed and weighed on a balance (MC 210S, Sartorius, Germany). The beetles were kept in rearing cages (40×30×30 cm) and fed the same diet as during the larval stage until they were used for the analysis of their hemolymph (antimicrobial activity, IPMP content). Preimaginal survival was monitored as the number of adults obtained from the pupae of each cohort. Fecundity and other oviposition parameters were monitored for a total period of 49 d. Fifteen pairs of beetles for each food treatment (aphids or *E. kuehniella* eggs) were kept individually in Petri dishes (9 cm diam). The number of eggs and egg clutches were recorded daily. Males were replaced when they had died.

For some experiments, adult beetles were divided into three different morphological groups based on elytral coloration: 1) melanic *spectabilis* morphs: black elytra with two red dots on either elytron, 2) *succinea* 1 morph with many intensively black dots on orange colored elytra, and 3) *succinea* 2 morphs with none or very few, faint black markings on orange elytra. These three morphotypes occurred in our laboratory colony and in the field populations found in the vegetation surrounding the facilities of the Julius Kühn-Institut, Dossenheim.

Field-collected Beetles For IPMP analysis, pupae of *H. axyridis* were collected in April 2011 in South Germany (Dossenheim, Siebeldingen and surroundings) from leaves of *Prunus persica*, *P. cerasus*, *P. spinosa*, *P. domestica*, *P. mahaleb*, *Malus domestica*, *Acer platanoides*, *Hedera helix*, *Sambucus nigra*, and *Corylus avellana*. After eclosion, adults were kept without food (experiment 1) or fed the particular aphid species found on this specific host plant that had also served as prey during larval development (experiment 2). Aphids were identified as *Myzus varians* on *P. persica*, *Brachycaudus helichrysi* on *P. domestica*, *Dysaphis plantaginea* on *M. domestica*, *Drepanosiphon platanoides* on *A. platanoides*, *Aphis hederæ* on *H. helix*, and *A. sambuci* on *S. nigra*. The aphid species on the remaining plants could not be identified.

In experiment 1, the IPMP contents of the hemolymph of the adult ladybird beetles were analyzed 3 d after emerging without providing any food for the hatched adults. In experiment 2, newly hatched adults were fed for 5 d with aphids obtained from the respective plants where pupae were collected. After this feeding period, the IPMP content of these beetles was measured by GC-MS analyses. Additionally, 30 adults each of *H. axyridis* and *C. septempunctata* were collected on grape berries of several *Vitis* hybrids from a vineyard around Geilweilerhof, Siebeldingen (September 2011) and their IPMP contents were also analyzed.

Microorganisms Gram positive *Bacillus subtilis* and *B. thuringiensis* ssp. *tenebrionis* (strain 10 BI 256–82), gram negative *Escherichia coli* (K12/D31), and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (DSM 70499) were used as model test organisms. All strains were obtained from the collection at the Julius Kühn-Institut, Dossenheim. Prior to the assays, liquid Mueller Hinton Broth was inoculated with test bacteria; yeast was cultivated in Sabouraud Dextrose Broth. Population growth of the overnight cultures (28°C) was monitored through its optical density as absorbance at 600 nm. Prior to the assays, each culture was diluted to a final concentration of 10⁶ CFU.

Determination of Antimicrobial Activity in the Hemolymph of *Harmonia axyridis* The antimicrobial activity in the hemolymph of adult *H. axyridis* was evaluated with broth dilution assays in 96-well microtiter plates (Sarstedt). The assays to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of each hemolymph pool were conducted as described in Gross et al. (2010). Hemolymph was collected from live, unchallenged adults. Insects were used for the assays after they had reached sexual maturity, i.e., after the onset of oviposition in each cohort. Beetles were separated by sex, elytral color, and diet. We prepared 40 µl hemolymph solutions at a concentration of 5 µl hemolymph/ml sterile water. This stock solution was applied to the first well of a serial dilution plate, and then diluted 1:2 with each of

the following pipetting steps until the 12th well in each row of the plate. The amount removed from the last well was discarded. Aliquots of 100 µl of bacterial or fungal cultures were added to each of the 96 wells. Depending on the amount of hemolymph obtained from the beetles for each hemolymph pool, two or three rows were filled per test factor and microorganism. All tests were done in four independent replications. In each assay, the growth inhibition of all test organisms was compared to an antibiotic as a positive reference. Starting concentrations of 50 µg gentamycin/ml sterile water and of 50 µg nystatin/ml dimethylsulfoxid were used, respectively, as controls for bacterial and fungal growth inhibition. Test plates were incubated in a shaker (160 rpm) at 28°C. After 20 h, growth inhibition was evaluated visually as clear wells. This visual control was confirmed with a spectrophotometer through changes in absorption at 600 nm (Microplate Reader Fluostar Omega, BMG Labtech, USA). The minimal inhibitory concentration (MIC) is defined as the minimal concentration of hemolymph or antibiotic that causes complete growth inhibition of the microorganism tested (DIN norm 58940). For each sample, the most abundant minimal inhibitory concentration for the rows from each hemolymph pool and the four replications was taken as MIC for the tested factor and microorganism.

Test of Antimicrobial Properties of Methoxypyrazine Compounds In order to test for potential antimicrobial properties of methoxypyrazine compounds present in the hemolymph of *H. axyridis*, we used commercially available 2-isobutyl-3-methoxypyrazine (IBMP), IPMP, and 2-secbutyl-3-methoxypyrazine (SBMP) (SIGMA Aldrich Nr. 297666, Nr. 243132 and Nr. 243116) at a concentration of 1 µg/ml, as these compounds were previously identified in the hemolymph of *H. axyridis* (Cai et al., 2007; Cudjoe et al., 2005; Kögel et al., 2012b). The solutions were used in MIC assays in concentrations of 1 µg/ml and 0.01 µg/ml (diluted 1:100 in a water/ethanol (1:1) mixture) against the four microorganisms mentioned above. Four replications were carried out for each substance and concentration.

Comparison of Diet Effects on the Chemical Defense (IPMP content) of *H. axyridis* and *C. septempunctata* Beetles were weighed and sexed prior to the analyses. A single beetle was subsequently crushed in 10 ml of Milli-Q-water (Millipore Corporation, USA) in a mortar. The sample then was transferred to a 20 ml round bottom glass headspace vial. Three g of sodium chloride and 10 ng of an internal standard (2-isopropyl-3-ethoxypyrazine (IPEP)) were added. For each feeding group and beetle species or morphotype, 10 replications were done.

Headspace-sampling and Chemical Analysis Volatile compounds present in the hemolymph of both ladybird species

were extracted using headspace-solid phase microextraction (HS-SPME). Beetle headspace was sampled using a divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane fiber (Sigma Aldrich Nr. 57328-U DVB/Carboxen/PDMS) and a manual fiber assembly. The sample vial was heated to 40°C for 20 min in a water bath before fiber exposure to request a subsequent headspace equilibration. After exposure in the headspace for 30 min at a constant temperature of 40°C under continuous stirring, the fiber was thermally desorbed in a GC injection port in splitless mode (Agilent 6890) at 250°C for 2 min and further thermally cleaned for 3 min with 10 ml/min split flow. Coupled gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) was used for analyses. Pyrazines were separated by the following procedure: the GC program was started at 40°C and held for 6 min; then temperature was raised to 100°C at 15°C/min; at 3°C/min to 160°C; at 25°C/min to 200°C; and finally temperature was held at 200°C for 5 min. The column was a DB-Wax (30 m length, 0,250 mm I.D., 0.50 µm film thickness; J&W Scientific). Helium was used as carrier gas. For the first 12 min, an FID was used and afterwards the system was switched to a MS (Agilent 5975B) in SIM Mode. The selected mass channels were m/z 137 and 152 for IPMP and 137 and 151 for IS.

GC-Data Analysis Data peaks were analyzed using the ChemStation D.02.00.611 software (Agilent Technologies). Identification of IPMP in beetles' hemolymph was done by comparing mass spectra and retention time with synthetic IPMP as reference substance. Concentrations of the reference samples were similar to those found in target samples. Calibration curves were prepared for five concentrations ranging from 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5 ng of IPMP and IPEP as internal standard per liter in water solution. Quantification was done by comparing the peak areas of IPMP and internal standard in counts. The standard addition method was used to identify possible matrices effects. Due to equal extraction methods, absolute and relative quantities of IPMP could be calculated. The contents are represented as ng IPMP/g fresh weight of beetles.

Statistical Analysis The numbers of eggs and egg clutches, adult body weight, and larval development times were statistically compared between different treatments (food) with Mann–Whitney U -tests (Sachs, 1992). The sex ratio and percentage preimaginal survival of beetles reared on different diets were compared by χ^2 -tests. Due to normality and homogeneity of data, the comparisons of IPMP contents between different treatments were analyzed by ANOVA followed by *post-hoc*-tests of Least Significant Difference between means

(LSD). Statistical analyses were done with SPSS statistics software 19 (IBM 2011).

Results

Diet Effects on Life History Parameters and Fecundity of *Harmonia axyridis* The total duration of the larval developmental time (i.e. four larval stages) was not different for the two diet regimes (Table 1, Mann–Whitney U test, diet 1 $N=104$ pupae obtained, diet 2 $N=166$ pupae obtained, $P>0.05$). Preimaginal survival ($\chi^2=0.09$, $df=1$, $P>0.05$), adult weight (Mann–Whitney U test, $N>30$ beetles per sex and diet, $P>0.05$), and sex ratio ($\chi^2=0.42$, $df=1$, $P>0.05$) were also similar (Table 1). By contrast, all fecundity parameters differed significantly between aphid and *E. kuehniella* eggs diets (Table 1). Aphid fed female *H. axyridis* laid on average more than twice the number of egg clutches (Mann–Whitney U test, $N=15$, $P<0.001$), and the total number of eggs doubled the eggs laid by *E. kuehniella* egg fed females (Mann–Whitney U test, $N=15$, $P<0.001$). Thus, fecundity (eggs/female) and oviposition rate (eggs/female/day) was more than twice as high for aphid fed beetles than for egg fed beetles (Table 1 and Fig. 1, Mann–Whitney U test, $P<0.001$). Survival of female beetles in the oviposition trials did not differ between diets.

Determination of the Antimicrobial Activity in the Hemolymph No difference in the antimicrobial activity of the hemolymph between female and male beetles was observed. Thus, data were combined for both sexes in Fig. 2. Independent from the diet ingested, antimicrobial activity in the hemolymph of *H. axyridis* was most effective against *S. cerevisiae*, followed by gram negative *E. coli*, intermediate against gram positive *B. subtilis*, and least effective against *B. t. thuringiensis* (Fig. 2). Since differences in MIC values of one dilution step up or down lay within the normal variation of this serial dilution test, only differences in MIC values against the growth of *E. coli*, spanning various dilution steps, which were observed for *succinea* 2 morphs, can be regarded as a true effect of diet. No other differences in antimicrobial activity between the two diets or between color morphs were observed. Furthermore, no interactions of elytral color and feeding regime on antimicrobial activity in the hemolymph was found. According to DIN norm sheet 58940, a statistical analysis of MIC values is neither necessary nor possible (Deutsches Institut für Normung, 2010).

H. axyridis succinea 2 fed with aphids had lower MIC values against *E. coli* than *succinea* 1. In general, we observed more variability between morphs in the measurable growth inhibition for aphid reared beetles than for the beetles reared on *E. kuehniella* eggs (Fig. 2). Neither of the

Table 1 Life history parameters for *Harmonia axyridis* under two different feeding regimes. Larvae and adults were fed either live individuals of *Acyrtosiphon pisum* reared on *Vicia faba* or frozen eggs of *Ephestia kuehniella*. Two generations were compared for each diet

	<i>A. pisum</i>	<i>E. kuehniella</i>
Larval developmental time (d)	12.47±0.41 ^a	11.94±0.74 ^a
Preimaginal survival (%)	94.00 ^a	89.45 ^a
Adult weight (g) male	0.030±0.005 ^a	0.030±0.004 ^a
Adult weight (g) female	0.032±0.005 ^a	0.033±0.004 ^a
Sex ratio (% female)	48.4 ^a	40.2 ^a
Total number of egg clutches	218 ^a	101.5 ^b
Total number of eggs (N=15)	10,885 ^a	5,193.5 ^b
Mean number eggs/d	222.2±133.5 ^a	106±73.2 ^b
Fecundity (N=15) (total eggs/female during 49 d)	788.8 ^a	384.5 ^b
Oviposition rate (N=15) (eggs/female/d)	16.1±9.3 ^a	7.9±5.5 ^b

Data presented are mean values ± standard errors. ^a, ^b indicate significant differences ($P<0.05$).

pyrazine solutions caused a detectable growth inhibition in any of the four microorganisms tested.

Differences in IPMP Contents between *C. septempunctata* and Morphotypes of *H. axyridis* within One Feeding Group The contents of IPMP differed significantly between the different morphotypes of *H. axyridis*: *H. axyridis succinea* 2 and *H. axyridis spectabilis* contained less IPMP than *succinea* 1 when fed with *A. pisum* or on *E. kuehniella* eggs (LSD; $P<0.05$; Fig. 3). *C. septempunctata* contained significantly less IPMP than *H. axyridis* when fed on *A. pisum*. When fed additionally on grape juice, the IPMP content of *C. septempunctata* increased significantly (Fig. 3), and was higher than in all morphotypes of *H. axyridis*. When fed on *E. kuehniella*, no differences could be observed between *C. septempunctata* and *H. axyridis succinea* 1 and *H. axyridis spectabilis* (Fig. 3). No differences in IPMP contents between males and females of the same feeding group and with the same elytral color were detected (LSD; $P>0.05$). Likewise, no differences in IPMP

contents could be measured between *H. axyridis* and *C. septempunctata* adults collected from grapes in September 2011 (Mann–Whitney-*U* test; $P>0.05$).

Differences in IPMP Contents of Morphotypes of *H. axyridis* and *C. septempunctata* between the Feeding Groups and on Different Host Plants In beetles reared in the laboratory on *A. pisum*, *A. pisum*+grape juice and *E. kuehniella* eggs, significant differences in IPMP contents could be measured (Fig. 3). IPMP contents of all morphotypes of *H. axyridis* fed with *E. kuehniella* were higher than when fed on ‘*A. pisum*’ or ‘*A. pisum*+grape juice’ (LSD; $P<0.05$; Fig. 3). A diet of *A. pisum*+grape juice increased the IPMP contents of *C. septempunctata* in comparison to other diet treatments (LSD; *A. pisum*: $P=0.03$; *E. kuehniella*: $P=0.016$).

Significant differences in IPMP contents could be detected in adults that emerged from pupae of *H. axyridis* previously collected in the field on host plants with specific aphid prey: Larvae fed with aphids collected on *P. domestica* (*Brachicaudus helichrysi*), *P. mahaleb* (unknown aphid species), *C. avellana* (unknown aphid species), and *S. nigra* (*Aphis sambuci*) contained significantly less IPMP than larvae fed with aphids from *P. persica* (*Myzus varians*) (LSD; $P<0.05$; Fig. 4). In addition, larvae fed with *A. sambuci* (*S. nigra*) and aphids from *C. avellana* had lower IPMP contents than larvae fed on *D. platanoides* (*A. platanoides*) (LSD; $P<0.05$; Fig. 4).

No differences were found in IPMP contents when adults were fed on the respective host aphids for another five days after eclosion (Mann–Whitney-*U*-test; $P>0.05$).

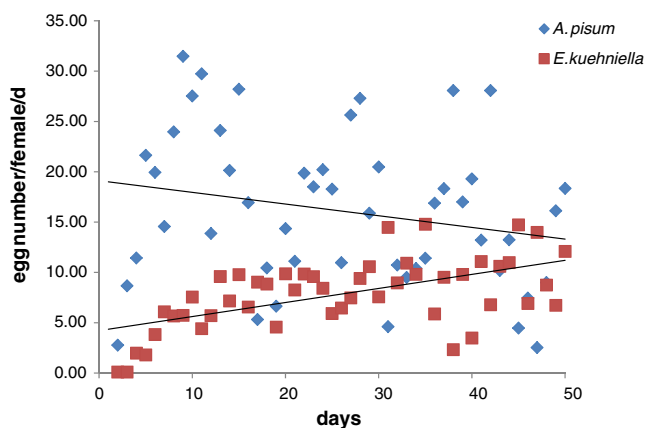
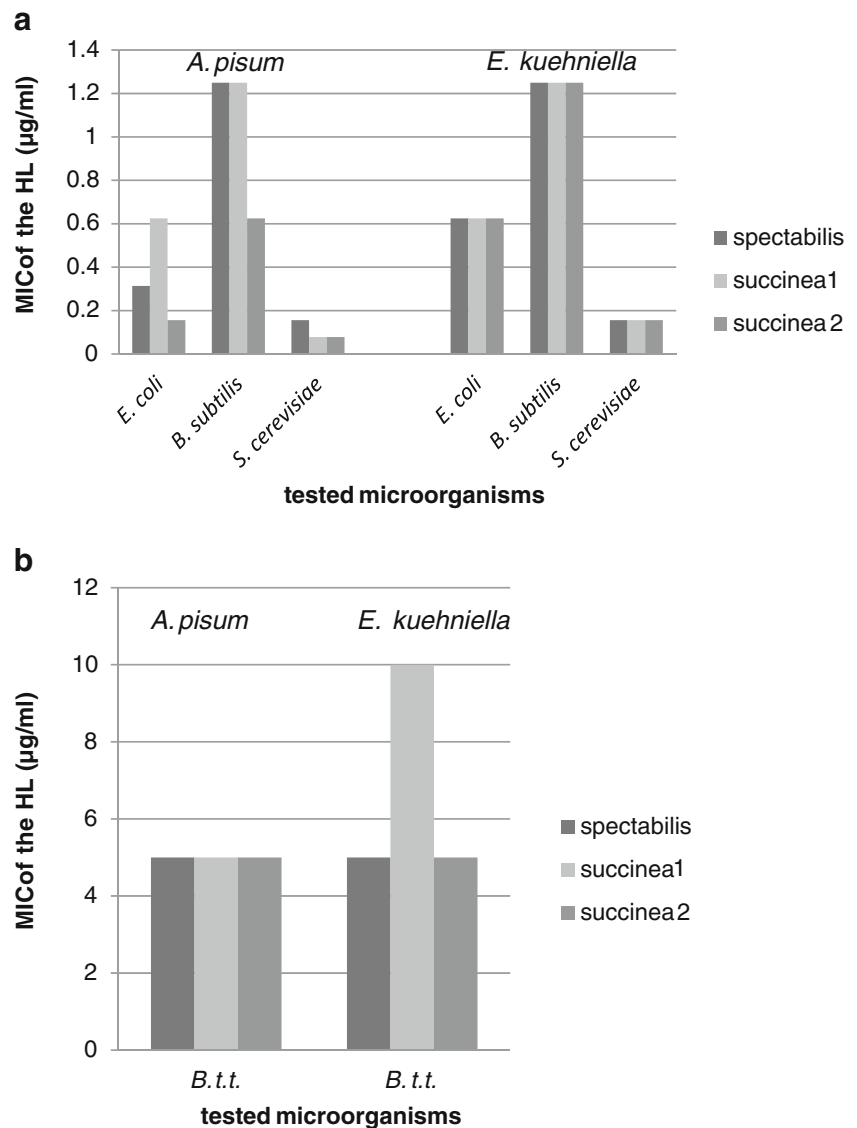


Fig. 1 Oviposition rate depicted as eggs/female/d laid under two different diet regimes, either live *Acyrtosiphon pisum* aphids or frozen eggs of *Ephestia kuehniella*, for 15 females of *Harmonia axyridis*. Eggs were counted for a total period of 49 days. Mann–Whitney *U* test, $P<0.001$. A linear trend line is given

Discussion

Under prevailing conditions in our climate chamber, we found a significant effect of diet on the fecundity of *H. axyridis* females. Fecundity of *H. axyridis* was higher under a diet of pea aphids compared to *E. kuehniella* eggs. Contrary to the

Fig. 2 Minimal inhibitory concentrations (MIC) in $\mu\text{g/ml}$ found in the hemolymph of live and unchallenged *Harmonia axyridis* adults. Antibacterial standard gentamycin had a MIC value of 0.195 $\mu\text{g/ml}$ against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, and of 1.563 $\mu\text{g/ml}$ against *Bacillus t. thuringiensis*. The antifungal standard nystatin had a MIC value of 0.781 $\mu\text{g/ml}$ against *Saccharomyces cerevisiae*. MIC values of the standards tested did not differ between diet treatments. Beetles were reared on a diet of live *Acyrtosiphon pisum* or frozen eggs of *Ephestia kuehniella*. **a)** Comparison of the MIC values of three morphotypes (*spectabilis*, *succinea* 1 and 2) from each diet regime against three different model microorganisms. **b)** Comparison of the MIC values of three morphotypes (*spectabilis*, *succinea* 1 and 2) for each diet regime against entomopathogenic *Bacillus thuringiensis tenebrionis*



results reported by Berkvens et al. (2008), we observed no differences in developmental parameters between the cohorts reared on either diet. Those authors concluded from their laboratory data that *E. kuehniella* eggs were a better food than live *A. pisum* aphids. Moreover, they related the observed differences to the distinct morphotypes. We did not compare morphotypes in this part of our study. While the preimaginal survival and fecundity was higher in our study than reported by Lanzoni et al. (2004), the oviposition rates were similar, and no differences in sex ratio were found in our experiments. A previous experiment by Specky et al. (2003) reported higher adult weight for female beetles after ingestion of *E. kuehniella* eggs compared to a diet of live *A. pisum*. The authors attributed their results to different amino acid and lipid contents in the food. Contrary to these authors, we observed no weight differences in the newly emerged adult beetles reared on either diet. Stathas et al. (2001) found similar fecundity and oviposition rates for *Aphis fabae* fed *H. axyridis* females as we did

for *E. kuehniella* eggs fed beetles. However, the fecundity observed for female beetles fed on pea aphids was twice as high in our study. McClure (1987) obtained a similar number of eggs laid per female when the beetles were reared permanently at 27°C with a diet of *A. pisum* as we did by alternating rearing temperature between 20 and 25°C. Thus, our data confirm the observation previously reported by Stathas et al. (2001) that temperature seems to affect mainly the duration of the preovipositional period.

To date, we do not know what contributes to the observed significant differences in fecundity between the diet regimes we tested. Specky et al. (2003) detected higher amounts of lipids and amino acids in meal moth eggs than in aphids, but higher glycogen content in live aphids than in the eggs. The authors also found differences in mortality and weight based on diet, with *E. kuehniella* eggs being the better diet. Likewise, they also found no effect of diet on larval development time. Interestingly, like Berkvens et al. (2008), they observed

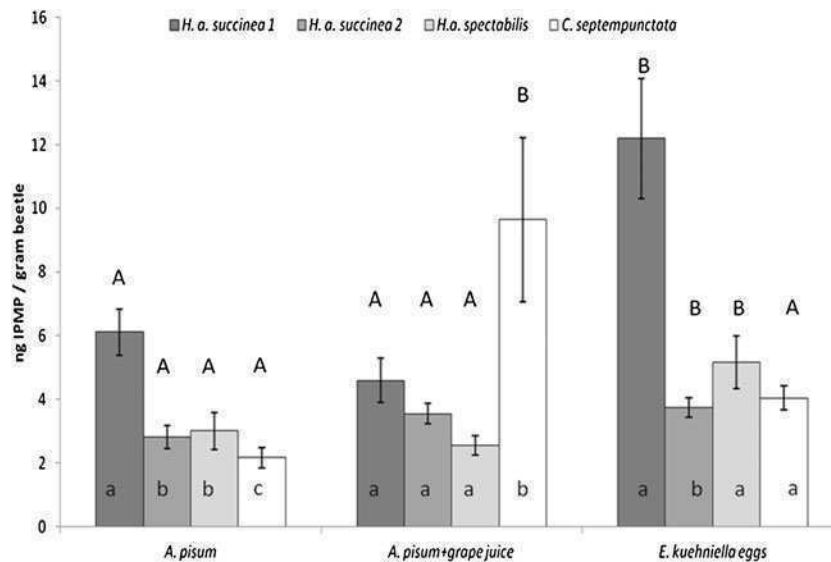


Fig. 3 Mean IPMP contents (ng/g fresh weight) \pm SE under different feeding conditions (*Acyrtosiphon pisum*, *A. pisum*+grape juice or *Ephestia kuehniella* eggs) of three morphotypes of *Harmonia axyridis* (*H. axyridis succinea* 1 (dark grey), *succinea* 2 (grey), and *H. axyridis spectabilis* (light grey) and *Coccinella septempunctata* (white). Small

letters indicate significant differences between morphotypes of *H. axyridis* and *C. septempunctata* within one feeding group ($P < 0.05$). Capital letters indicate significant differences of the two species between the feeding groups ($P < 0.05$). 10 replications were done in every treatments

significantly higher fecundity of the beetles reared with *E. kuehniella* eggs. Our results contradict both of those previous studies. In comparison to our experiment, however, the study by Specty et al. (2003) evaluated the fecundity of *H. axyridis* females only for a period of 10 days, whereas we followed the females for a total period of 49 days. For both treatments, egg laying activity showed strong daily variation (Fig. 1) until the

end of the observational period. It is striking, that in *H. axyridis* fed a diet of *A. pisum* the average number of eggs laid per female and day was much higher in the beginning of the egg laying period compared to a diet of *E. kuehniella*, and was then followed by a gradual decrease of egg numbers laid per female and day until the end of the observational period. By contrast, under a diet of *E. kuehniella*, the number of eggs

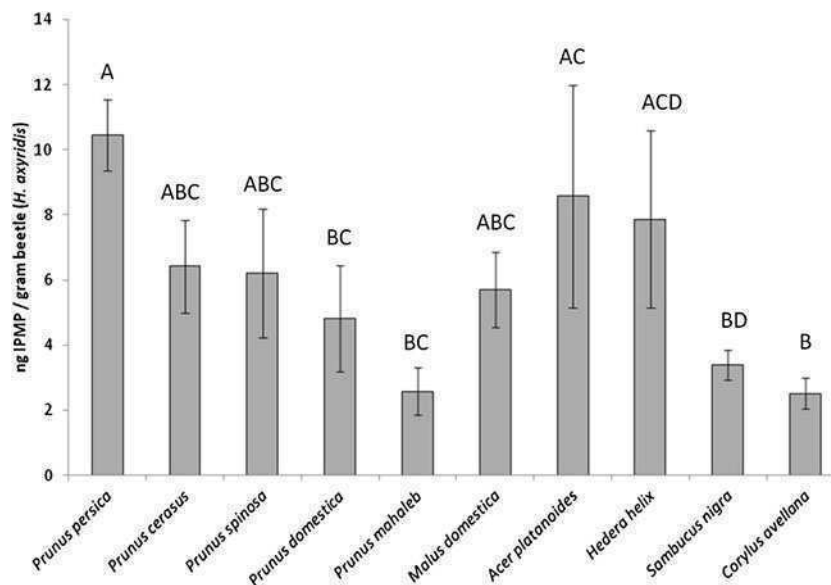


Fig. 4 Mean IPMP contents (ng/g fresh weight) \pm SE of three morphotypes of *Harmonia axyridis* 3 d after eclosion from field collected pupae on the respective plant species infested by given aphid species (*Myzus varians* on *Prunus persica* ($N=5$); *Brachycaudus helichrysi* on *Prunus domestica* ($N=7$); *Dysaphis plantaginea* on

Malus domestica ($N=9$); *Drepanosiphon platanoides* on *Acer platanoides* ($N=5$); *Aphis hederarum* on *Hedera helix* ($N=5$); *Aphis sambucis* on *Sambucus nigra* ($N=5$); Unknown aphids on *Prunus spinosa*, *Prunus mahaleb*, *Prunus cerasus* and *Corylus avellana* ($N=5$))

laid per female and day started out at a low level and was followed by a constant increase in egg numbers. Since we have no data on the hatching rate of these eggs, we cannot conclude how the age of the beetles and egg quality might be related for either diet. However, in terms of the number of eggs laid during the course of our study, *A. pisum* can clearly be considered a better diet for *H. axyridis* females.

Little is known on the influence of host plant secondary compounds experienced by *H. axyridis* through prey aphids (Francis et al., 2000; Alhmedi et al., 2008). As presented in this paper, larvae fed on *Aphis sambuci* had lower IPMP concentrations than larvae fed on other aphid species. *A. sambuci* was shown to be toxic for ladybird beetles as *C. septempunctata* (Nedved and Salvucci, 2008), but was consumed as non-optimum food by *H. axyridis* (Ungerova et al., 2010). Further, it was shown that *H. axyridis* can survive on a diet of *A. sambuci* contrary to *C. septempunctata* (Francis et al., 2000). The ability to detoxify plant allelochemicals like the cyanogenic and phenolic glycosides produced by *Sambucus nigra* (D'Abrosca et al., 2011) and sequestered by the aphids might be responsible for this difference in the diet spectrum of both coccinellid species. *Prunus mahaleb* is known for its high levels of coumarins. Those secondary compounds are supposed to cause feeding deterrence against Japanese beetles (*Popillia japonica*) (Patton et al., 1997). *Corylus avellanae* contains high concentrations of phenolic compounds (Amaral et al., 2010) that remain to be tested for physiological effects on aphids and their predators.

On the plants mentioned above, we collected *H. axyridis* pupae that supposedly developed as larvae with a diet of aphids feeding on the respective host plants. Thus, we conclude that lower IPMP content in the beetles emerged from those pupae compared to beetles fed on aphids from other host plants (Fig. 4) could indicate an interaction of host plant compounds sequestered in the aphids and ingested by the predatory beetles with autogenously produced methoxypyrazines. *Myzus persica* fed on leaves of *P. persica* was shown to be the most suitable food for *H. axyridis*, which preferred this aphid over *A. fabae*, *Macrosiphum albifrons*, *M. pseudorosae*, and *M. euphorbiae* (Soares et al., 2004; Finlayson et al., 2010). Alyokhin and Francis (2005) described a significant reduction of *M. persicae* following the establishment of *H. axyridis*. In the present study, the IPMP contents in the hemolymph of *H. axyridis* were significantly higher when fed a closely related aphid species (*M. varians*) than when fed other species. We hypothesize that *H. axyridis* may detoxify allelochemicals, but when feeding on chemically defended prey, it can not invest in high methoxypyrazine contents. Allelochemicals can thus influence the herbivore – predator relationship and the outcome of the biological control attempt or the prevalence of a predatory species on a certain host. Further studies on the interactions between chemically defended plants, sequestering insects and ladybird beetles are needed.

Adults fed for five days on the same prey as the larvae showed no higher IPMP contents than adults that were not fed after eclosion. Thus, in our study, larval diet seems to be the decisive factor for IPMP contents detectable in adult beetles. Under field conditions, larval mortality has been reported as the most important factor for the population dynamic of *H. axyridis* (Osawa 1993). Higher plasticity of larval IPMP content might be interpreted with regard to those field observations.

The results of our assays on the MIC values of the hemolymph of *H. axyridis* adults show evidence for an impact of beetle diet on the antimicrobial activity of their hemolymph. Similar to a previous study (Gross et al., 2010), we observed the highest susceptibility against the antimicrobial compounds in the hemolymph of *H. axyridis* for *E. coli* and *S. cerevisiae*. We found no differences in the antimicrobial activity of the hemolymph between male and female beetles, regardless of diet regime and elytral color. From our data, we cannot conclude that the three morphotypes of *H. axyridis* tested differ in the antimicrobial activity of their hemolymph. We found evidence, however, that a diet of pea aphids resulted in stronger growth inhibition of the most susceptible bacterium tested, the gram negative *E. coli*, when compared to the hemolymph activity of beetles fed on frozen *E. kuehniella* eggs. These results are congruent with the diet effects on fitness parameters observed here.

Within aphid fed beetles, we also observed higher activity against the growth of *E. coli* for the *succinea 1* morphs than for the less abundant *succinea 2* morphs. The *spectabilis* morphs had an intermediate growth inhibitory effect on this microorganism. Barnes and Siva-Jothy (2000) described a positive correlation of cuticle melanization with parasite resistance for *Tenebrio molitor* beetles. Since immune-function and melanin production use the same enzymatic pathway, increased melanization might interfere with immune defense (Carton and Nappi, 1997). Our results, however, do not provide evidence for this hypothesis. Based on our data, we cannot conclude that the rare melanic *spectabilis* morphs were less defended against microorganisms than the prevalent, less melanic *succinea 1* morphs of *H. axyridis*. In our assays, a growth inhibition of *B. t. tenebrionis* was only visible with the highest concentrations of hemolymph applied.

Furthermore, we found no evidence for antimicrobial properties of methoxypyrazines in our MIC tests. Thus, we conclude that the observed growth inhibition through the hemolymph from *H. axyridis* must be caused by other substances that remain to be identified. Pyrazines have long been described as major compounds in defensive odors emitted by different insect groups (Rothschild, 1961; Moore and Brown, 1981). Cudjoe et al. (2005) reviewed that *H. axyridis* contained a hundred times higher concentration of IPMP than *C. septempunctata*, which was described as the main compound of a so-called ladybird taint and can alter

the taste of wine (Pickering et al., 2004; Kögel et al., 2012a). This hypothesizes that *H. axyridis* could cause greater damage to viticulture than *C. septempunctata*. Recent studies have refuted this hypothesis: by using gaschromatography and olfactometer tests, it was found that *C. septempunctata* had the same amount of IPMP in its hemolymph as *H. axyridis*. Additionally, GC-nitrogen-phosphor detector analyses revealed nearly the same peak areas of IPMP in chromatograms of hemolymph headspace for both species (Kögel et al., 2012b). Additionally, Botezatu and Pickering (2010) described similar IPMP concentrations in wine produced after the addition of *H. axyridis* or *C. septempunctata* into crushed grapes. The differences in the concentrations of IPMP measured by Cudjoe et al. (2005), Botezatu and Pickering (2010), and our study might be due to the use of live beetles in our and Pickering's trials, while Cudjoe et al. (2005) analyzed frozen beetles.

In this study, several factors that may influence production of IPMP in ladybird beetles were investigated. IPMP contents of *H. axyridis* were significantly higher than of *C. septempunctata* in one out of three feeding treatments (*A. pisum*) in the laboratory. In one treatment (*A. pisum*+grape juice), *C. septempunctata* had higher IPMP contents than the Multicolored Asian ladybird beetle. In beetles fed on *E. kuehniella* eggs and in field-collected beetles, no significant differences between the two species could be observed. Thus, concerning methoxy-pyrazine contents, *H. axyridis* cannot be regarded as more hazardous for viticulture than *C. septempunctata*. In addition to development time, fresh body mass and fecundity, IPMP content can be used to evaluate food quality (Kalushkov and Hodek, 2004).

Elytral color apparently has an influence on IPMP content. Cai et al. (2007) previously described significant differences between the *succinea 1* and *succinea 2* morphs. In our study, *H. axyridis succinea 1* also contained significantly higher values of IPMP than *succinea 2*. Differences between *red* and *black color* morphs were studied before by Bezzerides et al. (2007). They showed that darker beetles were less defended against predators due to lower alkaloid contents. Slogett (2010) could not measure this, but they showed higher predation of non-melanic morphs by an orb-web spider. In our assays, significant differences in IPMP content were observed in one feeding group between the *H. axyridis succinea 1* morphs and *H. axyridis spectabilis* morphs (Fig. 4). Grill and Moore (1998) suggested elytral coloration was an effect of diet. In our experiments, larvae fed on *A. pisum*, *E. kuehniella*, or other aphid species did not differ in variation of elytral pigmentation.

Currently, we have no explanations for the differences detected in methoxy-pyrazine content in relation to elytral color. Bezzerides et al. (2007) argued that lower defense levels in melanic beetles could be balanced by other advantages, such as increased activity rates through a thermal advantage

during periods with lower temperature. The advantages of melanic beetles with respect to body temperature, activity range, and walking speed at lower temperatures have been shown for leaf beetles and ladybird beetles (De Jong et al., 1996; De Jong and Brakefield, 1998; Gross et al., 2004b; Michie et al., 2010).

In summary, our results provide further evidence for the influence of diet on fitness and defense chemistry in coccinellid beetles. It leads us to conclude that the predicted risk of a single specimen of *H. axyridis* for viticulture, with regard to tainting wine with IPMP, is not higher compared to specimens of other ladybird beetle species. However, *H. axyridis* will remain a threat for wine production due to huge population densities that may develop during some years, bearing the risk of tainting wine by getting harvested and processed in high numbers.

Our observations on factors influencing the IPMP content in both ladybird species examined show the need of further tritrophic level studies for *H. axyridis*. Field observations on prey species and the size of local sub-populations of this ladybird species, invasive in many countries, are important to understand the environmental factors that affect its competitive advantage over native ladybird species (Kindlmann et al., 2011).

Acknowledgments This work was supported by a grant from the 'Forschungsring Deutscher Weinbau' (FDW). The authors thank Svenja Hoferer and Sabine Wetzel (JKI Dossenheim) for technical assistance. We thank the Norddeutsche Pflanzenzucht KG for a gift of untreated seeds of *Vicia fabae* (cultivar "Tattoo"). We are grateful to M. Paulus and C. Emmerling from FB VI Geography/Biogeography, Trier University (Germany) for cooperation. Special thanks go to Th. Thieme (BioTest Labor, Sagerheide, Germany) who provided expertise on the determination of field collected aphid species, and Eva Gross (Dossenheim, Germany) and Lukasz Stelinski (Lake Alfred, Florida, USA) for linguistic improvements.

References

- AL ABASSI, S., BIRKETT, M. A., PETERSSON, J., PICKETT, J. A., and WOODCOCK, C. M. 1998. Ladybird beetle odour identified and found to be responsible for attraction between adults. *Cell. Mol. Life Sci.* 54:876–879.
- ALHMEDI, A., HAUBRUGE, E., and FRANCIS, F. 2008. Role of prey-host associations on *Harmonia axyridis* and *Episyrphus balteatus* reproduction and predatory efficiency. *Entomol. Exp. Appl.* 128:49–56.
- ALYOKHIN, A. and FRANCIS, F. 2005. Density-dependent regulation in populations of potato-colonizing aphids. *Popul. Ecol.* 47:257–266.
- AMARAL, J. S., VALENTÃO, P., ANDRADE, P. B., MARTINS, R. C., and SEABRA, R. M. 2010. Phenolic composition of hazelnut leaves: Influence of cultivar, geographical origin and ripening stage. *Sci. Hortic.* 126:306–313.
- ARMITAGE, S. A. O., THOMPSON, J. J. W., ROLFF, J., and SIVA-JOTHY, M. T. 2003. Examining costs of induced and constitutive immune investment in *Tenebrio molitor*. *J. Evol. Biol.* 16:1038–1044.

- BARNES, A. I. and SIVA-JOTHY, M. T. 2000. Density-dependent prophylaxis in the mealworm beetle *Tenebrio molitor* L. (Coleoptera: Tenebrionidae): cuticular melanization is an indicator of investment in immunity. *Proc. R. Soc. Lond. B* 267:177–182.
- BERKVEN, N., BONTE, J., BERKVEN, D., TIRRY, L., and DE CLERCQ, P. 2008. Influence of diet and photoperiod on development and reproduction of European populations of *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae). *BioControl* 53:211–221.
- BEZZERIDES, A. L., MCGRAW, K. J., PARKER, R. S., and HUSSEINI, J. 2007. Elytral color as a signal of chemical defense in the Asian ladybird beetle *Harmonia axyridis*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 61:1401–1408.
- BOTEZATU, A. and PICKERING, G. J. 2010. Ladybug (Coccinellidae) taint in wine, in A. G. Reynolds (ed.), *Understanding and Managing Wine Quality and Safety*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.
- BULET, P., COCIANICICH, S., DIMARCO, J.-L., LAMBERT, J., REICHHART, J.-M., HOFFMANN, D., HETRU, C., and HOFFMANN, J. A. 1991. Isolation from a coleopteran insect of a novel inducible antibacterial peptide and of new members of the insect defensin family. *J. Biol. Chem.* 266:24520–24525.
- CAI, L., KOZIEL, J. A., and O'NEAL, M. E. 2007. Determination of characteristic odorants from *Harmonia axyridis* beetles using *in vivo* solid-phase microextraction and multidimensional gas chromatography–mass spectrometry–olfactometry. *J. Chromatogr. A* 1147:66–78.
- CARTON, Y. and NAPPI, A. J. 1997. *Drosophila* cellular immunity against parasitoids. *Parasitol. Today* 13:218–227.
- CUDJOE, E., WIEDERKEHR, T. B., and BRINDLE, I. D. 2005. Headspace gas chromatography–mass spectrometry: a fast approach to the identification and determination of 2-alkyl-3-methoxypyrazine pheromones in ladybugs. *Analyst* 130:152–155.
- D'ABROSCA, B., DELLAGRECA, M., FIORENTINO, A., MONACO, P., PREVITERA, L., SIMONET, A. M., and ZARELLI, A. 2011. Potential allelochemicals from *Sambucus nigra*. *Phytochemistry* 58:1073–1081.
- DE JONG, P. W. and BRAKEFIELD, P. M. 1998. Climate and change in clines for melanism in the two-dot ladybird, *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Proc. Roy. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 265:39–43.
- DE JONG, P. W., GUSSEKLOO, S. W. S., and BRAKEFIELD, P. M. 1996. Differences in thermal balance, body temperature and activity between non melanic and melanic two-dot ladybird beetles (*Adalia bipunctata*) under controlled conditions. *J. Exp. Biol.* 199:2655–2666.
- DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG. 2010. DIN 58940: Susceptibility testing of pathogens to antimicrobial agents—Part 4: Evaluation classes of the minimum inhibitory concentration, pp. 354–60, in DIN-Taschenbuch Medizinische Mikrobiologie und Immunologie, Normen und weitere Unterlagen. Beuth-Verlag, Berlin and Cologne.
- FERRAN, A., NIKNAM, H., KABIRI, F., PICART, J. L., DEHERVE, C., BRUN, J., IPERTI, G., and LAPCHIN, L. 1996. The use of *Harmonia axyridis* larvae (Coleoptera: Coccinellidae) against *Macrosiphum rosae* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphididae) on rose bushes. *Eur. J. Entomol.* 93:59–67.
- FINLAYSON, C., ALYOKHIN A., GROSS S., and PORTER E. 2010. Differential consumption of four aphid species by four lady beetle species. *J. Insect Sc.* 10:10:31 available online: insectscience.org/10.31.
- FRANCIS, F., HAUBRIGE, E., and GASPARD, C. 2000. Influence of host plants on specialist/generalist aphids and on the development of *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *Eur. J. Entomol.* 97:481–485.
- FUKUNAGA, Y. and AKIMOTO, S. 2007. Toxicity of the aphid *Aulacorthum magnolia* to the predator *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) and genetic variance in the assimilation of the toxic aphids in *H. axyridis* larvae. *Entomol. Sci.* 10:45–53.
- GALVAN, T. L., BURKNESS, E. C., VICKERS, Z., STENBERG, P., MANSFIELD, A. K., and HUTCHISON, W. D. 2007. Sensory-based action threshold for multicolored Asian lady beetle-related taint in winegrapes. *Am. J. Enol. Viticult.* 58:518–522.
- GALVAN, T. L., KOCH, R. L., and HUTCHINSON, W. D. 2008. Impact of fruit feeding on overwintering survival of the multicolored Asian lady beetle, and the ability of this insect and paper wasps to injure wine grape berries. *Entomol. Exp. Appl.* 128:429–436.
- GRILL, C. P. and MOORE, A. J. 1998. Effects of a larval antipredator response and larval diet on adult phenotype in an aposematic ladybird beetle. *Oecologia* 114:274–282.
- GROSS, J., FATOUROS, N. E., and HILKER, M. 2004a. The significance of bottom-up effects for host plant specialization in *Chrysomela* leaf beetles. *Oikos* 105:368–376.
- GROSS, J., SCHMOLZ, E., and HILKER, M. 2004b. Thermal adaptations of the leaf beetle *Chrysomela lapponica* to different climes of Central and Northern Europe. *Environ. Entomol.* 33:799–806.
- GROSS, J., SCHUMACHER, K., SCHMIDTBERG, H., and VILCINSKAS, A. 2008. Protected by fumigants: beetle perfumes in antimicrobial defense. *J. Chem. Ecol.* 34:179–188.
- GROSS, J., EBEN, A., MÜLLER, I., and WENSING, A. 2010. A well protected intruder: the effective antimicrobial defense of the invasive ladybird *Harmonia axyridis*. *J. Chem. Ecol.* 36:1180–1188.
- HAINÉ, E. R., MORET, Y., SIVA-JOTHY, M. T., and ROLFF, J. 2008. Antimicrobial defense and persistent infection in insects. *Science* 322:1257–1259.
- HODEK, I. 1993. Habitat and food specificity in aphidophagous predators. *Biocontr. Sci. Technol.* 3:91–100.
- HODEK, I. and HONEK, A. 1996. *Ecology of Coccinellidae*. Kluwer, Dordrecht. 464.
- HUKUSIMA, S. and KAMEI, M. 1970. Effects of various species of aphids as food on development, fecundity and longevity of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae). *Res. Bull. Fac. Agric. Gifu Univ.* 29:53–66.
- JALALI, M. A., TIRRY, L., and DE CLERCQ, P. 2009. Effects of food and temperature on development, fecundity and life-table parameters of *Adalia bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *J. Appl. Entomol.* 133:615–625.
- KALUSHKOV, P. and HODEK, I. 2004. The effects of thirteen species of aphids on some life history parameters of the ladybird *Coccinella septempunctata*. *Biocontrol* 49:21–32.
- KARL, I., HOFFMANN, K. H., and FISCHER, K. 2010. Cuticular melanisation and immune response in a butterfly: local adaptation and lack of correlation. *Ecol. Ent.* 35:523–528.
- KINDLMANN, P., AMEIXA, O. M. C. C., and DIYON, A. F. G. 2011. Ecological effects of invasive alien species on native communities, with particular emphasis on the interactions between aphids and ladybirds. *Biocontrol* 56:469–476.
- KLAUSNITZER, B. and KLAUSNITZER H. 1997. *Marienkäfer: Westarp Wissenschaften*.
- KOCH, R. L. 2003. The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: a review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. *J. Insect Sci.* 3:32–48.
- KÖGEL, S., GROSS, J., and HOFFMANN, C. 2012a. Sensory detection thresholds of 'ladybird taint' in 'Riesling' and 'Pinot noir' under different fermentation and processing conditions. *Vitis* 51:27–32.
- KÖGEL, S., GROSS, J., HOFFMANN, C., and ULRICH, D. 2012b. Diversity and frequencies of methoxypyrazines in hemolymph of *Harmonia axyridis* and *Coccinella septempunctata* and their influence on the taste of wine. *Eur. Food Res. Technol.* 234:399–404.
- LANZONI, A., ACCINELLI, G., BAZZOCCHI, G. G., and BURGIO, G. 2004. Biological traits and life table of the exotic *Harmonia axyridis* compared with *Hippodamia variegata*, and *Adalia*

- bipunctata* (Coleoptera: Coccinellidae). *J. Appl. Entomol.* 28:298–306.
- LEE, K. P., SIMPSON, S. J., and WILSON, K. 2008. Dietary protein-quality influences melanization and immune function in an insect. *Funct. Ecol.* 22:1052–1061.
- MCCLURE, M. S. 1987. Potential of the Asian predator *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae), to control *Matsucoccus resinosa* Bean and Godwin (Homoptera: Margarodidae) in the United States. *Environ. Entomol.* 16:224–230.
- MICHIE, L. J., MALLARD, F., MAJERUS, M. E. N., and JIGGINS, F. M. 2010. Melanic through nature or nurture: genetic polymorphism and phenotypic plasticity in *Harmonia axyridis*. *J. Evol. Biol.* 27:1699–1707.
- MOORE, B. P. and BROWN, W. V. 1981. Identification of warning odour components, bitter principles and antifeedants in an aposematic beetle: *Metriorrhynchus rhipidius* (Coleoptera: Lycidae). *Insect Biochem.* 11:493–499.
- NEDVED, O. and SALVUCCI, S. 2008. Ladybird *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) prefers toxic prey in laboratory choice experiment. *Eur. J. Entomol.* 105:431–436.
- OSAWA, N. 1993. Population field studies of the aphidophagous ladybird beetle *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae): life tables and key factor analysis. *Res. Popul. Ecol.* 35:335–348.
- OSAWA, N. and NISHIDA, T. 1992. Seasonal variation in elytral colour polymorphism in *Harmonia axyridis* (the ladybird beetle): the role on non-random mating. *Heredity* 69:297–307.
- PATTON, C. A., RANNEY, T. G., BURTON, J. D., and WALGENBACH, J. F. 1997. Natural pest resistance of *Prunus* taxa to feeding by adult Japanese Beetles: role of endogenous allelochemicals in host plant resistance. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 122(5):668–672.
- PICKERING, G. J., LIN, J., RIESEN, R., REYNOLDS, A., BRINDLE, I., and SOLEAS, G. 2004. Influence of *Harmonia axyridis* on the sensory properties of white and red wine. *Am. J. Enol. Viticult.* 55:153–159.
- PICKERING, G. J., LIN, Y., REYNOLDS, A., SOLEAS, G., RIESEN, R., and BRINDLE, I. 2005. The influence of *Harmonia axyridis* on wine composition and aging. *J. Food Sci.* 70:128–135.
- ROSS, C. F., ROSALES, M. U., and FERNANDEZ-LOTKA, V. C. 2010. Aroma profile of Niagara grape juice contaminated with multi-coloured Asian lady beetle taint using gas chromatography/mass spectrometry/olfactometry. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45:789–793.
- ROTHSCHILD, M. 1961. Defensive odours and Muellierian mimicry among insects. *Trans. Roy. Ent. Soc. Lond.* 113:101–121.
- SACHS, L. 1992. *Angewandte Statistik*, 7th ed. Springer Verlag, Berlin.
- SEO, M. J., KIM, G. H., and YOUNG, Y. N. 2008. Differences in biological and behavioural characteristics of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) according to colour patterns of elytra. *J. Appl. Entomol.* 132:239–247.
- SLOGGETT, J. J. 2010. Colour pattern polymorphism and chemical defence in *Harmonia axyridis*. *IOBC/wprs Bulletin* 58:114–123.
- SNYDER, W. E., JOSEPH, S. B., PREZIOSI, R. F., and MOORE, A. J. 2000. Nutritional benefits of cannibalism for the lady beetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) when prey quality is poor. *Environ. Ent.* 29:1173–1179.
- SOARES, A. O., CODERRE, D., and SCHANDERL, H. 2001. Fitness of two phenotypes of *Harmonia axyridis* (Coleoptera: coccinellidae). *Eur. J. Entomol.* 98:287–293.
- SOARES, A. O., CODERRE, D., and SCHANDERL, H. 2003. Effect of temperature and intraspecific allometry on predation by two phenotypes of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae). *Environ. Entomol.* 32:939–944.
- SOARES, A. O., CODERRE, D., and SCHANDERL, H. 2004. Dietary self-selection behaviour by the adults of the aphidophagous ladybeetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *J. Animal Ecol.* 73:478–486.
- SOARES, A. O., CODERRE, D., and SCHANDERL, H. 2005. Influence of prey quality in the fitness of two phenotypes of *Harmonia axyridis* adults. *Ent. Exp. Appl.* 114:227–232.
- SPECTY, O., FEBVAY, G., GRENIER, S., DELOBER, B., PIOTTE, C., PAGEAUX, J. F., FERRAN, A., and GUILLAUD, J. 2003. Nutritional plasticity of the predatory ladybeetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): comparison between natural and substitution prey. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 52:81–91.
- STATHAS, G. J., ELIOPOULOS, P. A., KONTODIMAS, D. C., and GIANNOPAPAS, J. 2001. Parameters of reproductive activity in females of *Harmonia axyridis*. *Eur. J. Entomol.* 98:547–549.
- SU, W., MICHAUD, J. P., RUNZHI, Z., FAN, Z., and SHUANG, L. 2009. Seasonal cycles of assortative mating and reproductive behaviour in polymorphic populations of *Harmonia axyridis* in China. *Ecol. Entomol.* 34:483–494.
- TEDDERS, W. L. and SCHAEFER, P. 1994. Release and establishment of *Harmonia axyridis* (Coleoptera, Coccinellidae) in the southeastern United-States. *Entomol. News* 105:228–243.
- UNGEROVA, D., KALUSHKOV, P., and NEDVED, O. 2010. Suitability of diverse prey species for development of *Harmonia axyridis* and the effect of container size. *IOBC/wprs Bulletin* 58:165–174.
- WILSON, K., COTTER, S. C., REESON, A. F., and PELL, J. K. 2001. Melanism and disease resistance in insects. *Ecol. Lett.* 4:637–649.

The ladybird beetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) as a possible predator of grape phylloxera *Daktulosphaira vitifoliae* (Hemiptera: Phylloxeridae)

SUSANNE KÖGEL¹, MANUELA SCHIELER^{1,2} and CHRISTOPH HOFFMANN¹

¹Julius Kühn-Institut, Federal Research Center for Cultivated Plants, Institute for Plant Protection in Fruit Crops and Viticulture, Geilweilerhof, D-76833 Siebeldingen, Germany; e-mail: Susanne.koegel@jki.bund.de

²Trier University, FB VI, Department of Biogeography, D-54286 Trier, Germany

Key words. Coleoptera, Coccinellidae, *Harmonia axyridis*, Hemiptera, Phylloxeridae, *Daktulosphaira vitifoliae*, grapevine, *Vitis vinifera*, consumption

Abstract. The ladybird beetle *Harmonia axyridis* (Pallas 1773) has been used for biological control in several countries. However, it became invasive in some of those countries. *Coccinella septempunctata* (Linné 1758) is a native species in Europe. It feeds mainly on aphids and can be very abundant. As far as is known there are no effective natural enemies of the grape phylloxera *Daktulosphaira vitifoliae* (Fitch 1855) in Europe. The potential of the above two ladybird species for reducing the abundance of the grapevine pest *D. vitifoliae* has not been previously investigated. In this study, the consumption and developmental parameters of *H. axyridis* and *C. septempunctata* fed on *D. vitifoliae* were determined in the laboratory. In a field trial, the occurrence of *H. axyridis* on grapevines with or without leaf galls of *D. vitifoliae* was compared. In contrast to *C. septempunctata*, *H. axyridis* was able to complete its development using *D. vitifoliae* as a source of food. In addition, adult *H. axyridis* consumed significantly more *D. vitifoliae* eggs than *C. septempunctata*. Within 24 h *H. axyridis* consumed up to 1400 eggs of *D. vitifoliae*. However, based on the fitness parameters “developmental time”, percentage “survival” and “adult weight”, this diet was less suitable for *H. axyridis* than the eggs of *Ephesthia kuehniella*. During field observations over a period of two years *H. axyridis* was repeatedly observed feeding on grape phylloxera leaf galls, which indicates that *H. axyridis* uses grape phylloxera as prey. *H. axyridis* was significantly more abundant on leaves with leaf galls of *D. vitifoliae* than on leaves without galls. *C. septempunctata* was rarely found on grape leaves with or without leaf galls. These results indicate that overall *H. axyridis*, unlike *C. septempunctata*, is a predator of *D. vitifoliae* and could potentially reduce grape phylloxera numbers in vineyards.

INTRODUCTION

The Multicoloured Asian ladybird beetle, *Harmonia axyridis* (Pallas 1773) (Coleoptera: Coccinellidae), was introduced from Asia into North America and Europe as a biocontrol agent (Ferran et al., 1996; Koch, 2003). It has become an invasive species in these countries. In Central Europe 96 Coccinellidae species are described as native (Klausnitzer & Klausnitzer, 1997) of which the abundant seven-spot ladybird beetle *Coccinella septempunctata* (Linné 1758) (Coleoptera: Coccinellidae) is one.

There are numerous studies on consumption rates and life table parameters, such as fecundity, developmental time, percentage mortality and fresh weight of adults, of both these species of ladybird when fed different species of aphid (Michaud, 2000; Specky et al., 2003; Seko & Miura, 2008; Finlayson et al., 2009; Xue et al., 2009). Life tables of Coccinellidae can vary depending on the diet and can be used as an indicator of the fitness of these insects (Kalushkov & Hodek, 2004).

When aphids become scarce in autumn, *H. axyridis* is able to feed on damaged fruit, like grapes (Galvan et al., 2006), and as a consequence may be accidentally processed together with the grapes during harvest. Release of their hemolymph into the must gives the wine a specific taste called “ladybird taint” or “ladybug taint” (Galvan et

al., 2007; Pickering et al., 2007; Kögel et al., 2012b). Therefore *H. axyridis* is mainly considered to be a pest in viticulture. In addition to *H. axyridis*, *C. septempunctata* can also cause this specific off-flavour (Botezatu & Pickering, 2010; Kögel et al., 2012a). Both species can be found in and around vineyards.

Grape phylloxera *Daktulosphaira vitifoliae* (Fitch 1855) is a gall forming insect infesting roots and leaves of grapevine (*Vitis vinifera*, American species of *Vitis* and hybrids). This pest is native to North America and invasive in other regions such as Europe. In the beginning of the 20th century, feeding of *Phylloxera* on nongrafted *V. vinifera* caused considerable damage in Europe. The problem was solved by grafting *V. vinifera* onto American (non-*vinifera*) rootstocks tolerant to *D. vitifoliae*. Recently, *D. vitifoliae* has been repeatedly found on wild rootstocks in the vicinity of vineyards in Germany (Hoffmann, 2011). During a period of three consecutive years (2009–2011) we observed *H. axyridis* feeding inside the leaf galls of grape phylloxera. We also observed male and female *H. axyridis* copulating on vine leaves with galls, which might indicate that *Phylloxera* galls represent a suitable food resource for the reproduction of this ladybeetle.

In this context we decided to address the following topics:

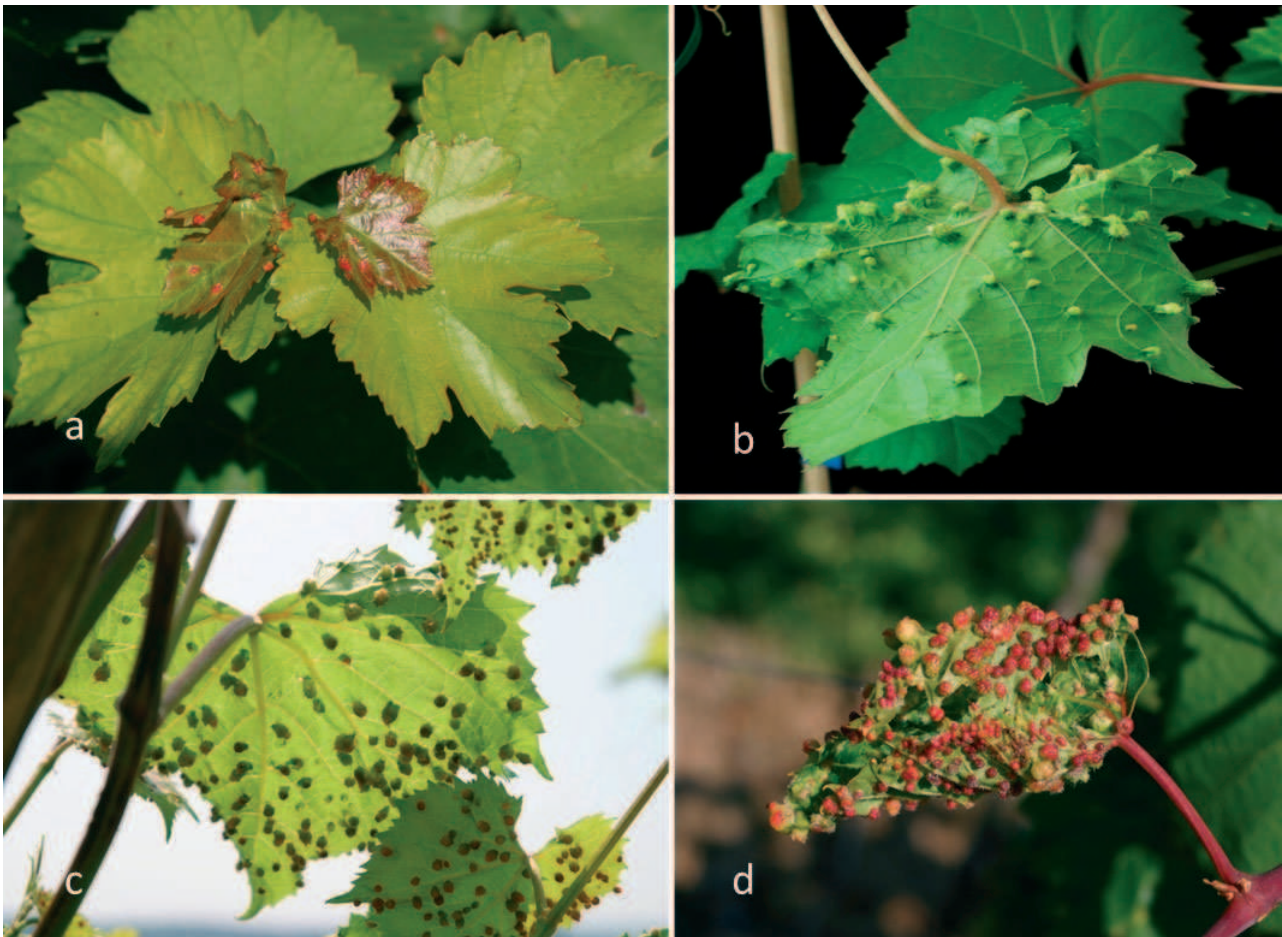


Fig. 1a–d. Levels of infestation of grapevine leaves by grape phylloxera: category 1–2 (a), category 3–5 (b), category 6–7 (c) and category 8–9 (d).

- Is *H. axyridis* able to develop from egg to adult when feeding exclusively on grape phylloxera?
- How do the rates of consumption of grape phylloxera by *H. axyridis* compare with those of *C. septempunctata*?
- Is the feeding of *H. axyridis* on phylloxera leaf galls in vineyards a random phenomenon or of common occurrence?

With these questions in mind, we tried to assess the rates at which *H. axyridis* and *C. septempunctata* consumed the eggs of *D. vitifoliae* under defined laboratory conditions. In addition, developmental parameters of the two species feeding on grapevine leaves, with and without phylloxera leaf galls, were determined and compared to those recorded when fed on a diet of *E. kuehniella* eggs. Furthermore, the association of *H. axyridis* with the leaf galls produced by grape phylloxera was investigated in the field in 2010 and 2011. We used *C. septempunctata* as a control species in this study because it is the second most common species of ladybird in German vineyards and can also be found hiding in grapes at harvest time.

The combined results of the laboratory and field experiments should provide information on whether *H. axyridis* is an important predator of *D. vitifoliae*.

MATERIAL AND METHODS

Laboratory study

Prey suitability

The neonate larvae came from laboratory cultures kept in a controlled climate chamber at the Julius Kühn-Institute (JKI), Dossenheim, Germany. One neonate larva of either *H. axyridis* or *C. septempunctata* was placed in each Petri dish (diameter = 15 cm). In each dish there were two leaves of *Vitis* sp. infested with leaf galls of *D. vitifoliae* (cat. 9; see Material and Methods field trial). In addition, there were 2 control dishes with: (i) two leaves of *Vitis* sp. without leaf galls and (ii) eggs of *E. kuehniella* (500 mg).

Water was supplied via a cotton wool pad. The Petri dishes were placed in a controlled climate chamber (16L : 8D, 24°C, 70–80% RH). Every 24 h the larval stages and pupae were monitored and their developmental times and mortality recorded until the adults emerged from the pupae. Every 48 h the leaves and *E. kuehniella* eggs were replaced by fresh material. The newly emerged adults were weighed and their sex determined. This was replicated twenty times for each species.

Egg consumption by adult ladybird beetles

Adults of *C. septempunctata* and *H. axyridis* were collected in the field 24 h before they were used in this experiment. They were collected at Siebeldingen (Germany) from a field planted with field beans (*Vicia faba*). These beetles were kept in plastic containers in a climate chamber (16L : 8D, 24°C, 70–80% RH) without food for 24 h.

TABLE 1. Developmental time of the larval instars and pupae, fresh mass of newly emerged adults, prey suitability (SL) and percentage mortality of the ladybird beetles *H. axyridis* and *C. septempunctata* reared on *Vitis vinifera* leaves with and without leaf galls of *D. vitifoliae*, or on a diet of *E. kuehniella* eggs in Petri dishes in a climate chamber (16D : 8D, 24°C, 70–80% RH).

Food given	Species (N at begin = 20)	Mean ± SD developmental time [d]						Adult weight [mg] ± SD	SL ± SD	Mortality [%]
		Instars				Pupa	Total			
		1 st	2 nd	3 ^d	4 th					
Leaves with leaf galls of <i>D. vitifoliae</i>	<i>H. axyridis</i>	2.0 ± 0.0	3.9 ± 2.3	3.8 ± 1.5	7.8 ± 1.4	5.8 ± 2.3	20.5 ± 3.9 ^{*a}	14.8 ± 3.9 ^{*a}	0.6 ^{*a} ± 0.2	53.3 ^{*A*}
	<i>C. septempunctata</i>	1.8 ± 0.4	1.0 ± 0.0	–	–	–	–	–	–	100 ^{*B*}
Leaves without leaf galls	<i>H. axyridis</i>	2.0 ± 0.0	–	–	–	–	–	–	–	100 ^{*A}
	<i>C. septempunctata</i>	1.0 ± 0.0	–	–	–	–	–	–	–	100 ^{*A}
<i>E. kuehniella</i> eggs	<i>H. axyridis</i>	1.0 ± 0.0	1.9 ± 0.9	2.0 ± 0.6	4.8 ± 0.6	4.8 ± 0.5	14.7 ± 0.7 ^{*A*}	24.7 ^{*A*} ± 2.5	2.5 ^{*A*} ± 0.4	13.3 ^{*b}
	<i>C. septempunctata</i>	1.3 ± 0.5	2.1 ± 0.7	2.5 ± 0.5	5.0 ± 0.6	4.9 ± 0.7	15.9 ± 1.2 ^{*A}	26.5 ^{*A} ± 1.4	2.4 ^{*A} ± 0.3	20.0 ^{*b}

^{*A}, ^{*B} indicates significant differences between the two species (Mann-Whitney-U-test, $p < 0.001$)

^{*a}, ^{*b} indicates significant differences between the diet groups within one species (Mann-Whitney-U-test, $p < 0.05$)

Grapevine leaves infested with leaf galls of *D. vitifoliae* were collected from a vineyard at the Julius Kühn-Institute in Siebeldingen (Germany). In the laboratory, the leaf galls were dissected with a razor blade and the eggs were collected using the washing method described by Hill & Schlamp (1984). Eggs were then transferred, using a paint brush, on to a Ø 9 cm filter paper in a Petri dish along with one adult ladybird beetle, which had been previously weighed and sexed, and then the dish was put in the climate chamber. Each adult beetle of *H. axyridis* and *C. septempunctata* was provided with either 100, 200 or 500 eggs. Because of differences in their feeding behaviour, *H. axyridis* was additionally also provided with 1000, 2000, 3000 or 4000 eggs/beetle and *C. septempunctata* 10, 20 or 50 eggs/beetle. After 24 h the remaining eggs were counted. Hatched nymphs of *D. vitifoliae* were counted as eggs. There were ten replicates of each treatment.

Field study

Field trials were carried out in the same vineyard near Siebeldingen in 2010 and 2011 from July through to the end of September. The vineyard was planted with grapevines of different genotypes (interspecific crossings) and vines were not sprayed during the course of this study. Grapevines were marked and sampled as follows: 20 infested vines (including several categories \geq cat. 3–5) and 20 vines not infested with leaf galls of *D. vitifoliae* (cat. 1–2) in 2010 and the same design was used with 50 vines each in 2011. For example in 2011, 50 grapevines were marked as uninfested (cat. 1–2), 12 were marked as cat. 3–5, 19 as cat. 6–7 and 19 as cat. 8–9. The grapevines were of several genotypes in both years and no grapevine was used twice.

The levels of infestation with grape phylloxera of the selected vines was ranked, based on the guidelines of the German Federal Plant Variety Office (“Bundessortenamt”; Anonymous, 1989), into one of 9 categories (cat.):

Cat. 1–2 = no or just a few leaf galls, probably no eggs (Fig. 1a)

Cat. 3–5 = few leaf galls (Fig. 1b)

Cat. 6–7 = big and many leaf galls (Fig. 1c)

Cat. 8–9 = big and numerous leaf galls (Fig. 1d)

All marked vines were searched visually weekly for adults of *H. axyridis* and *C. septempunctata*. In addition, all marked vines

were checked for mildew, mites or other possible sources of food for *H. axyridis*.

Data analysis

Statistical analyses were performed using SPSS statistics 17 (IBM). Differences in consumption rate and developmental parameters were analyzed using Mann-Whitney-U-tests. Differences between the categories 1–2, 3–5, 6–7 and 8–9 in the field trials were analyzed using Kruskal-Wallis-H-tests. The level of significance was set at $\alpha = 0.05$. To check the suitability of *D. vitifoliae* as food for the ladybird beetles under laboratory conditions the prey suitability parameter (SL) was calculated as $SL = m / t$ (m = fresh mass of newly emerged adults in mg; t = days from hatching of the 1st instar to pupation) (Ungerova et al., 2010).

RESULTS

Laboratory study

Prey suitability

Unlike *C. septempunctata*, *H. axyridis* was able to complete its life cycle from the 1st instar to adult when provided with only grapevine leaves with leaf galls (Table 1). The percentage mortality of *H. axyridis* was 53%, while all the *C. septempunctata* died in the 1st or 2nd instar. The percentage mortality of the two species differed significantly ($p < 0.001$).

Both larvae and adult *H. axyridis* were observed feeding on leaf galls. For this the width and structure of the opening of the gall on the upper leaf surface is likely to be a critical factor. This opening is protected by hairs, which bend outwards. Both 1st and 2nd instar larvae were observed within the leaf galls and are therefore apparently small enough to pass through the opening. Older immature stages as well as adult beetles were commonly observed trying to remove the hairs, either by pushing them aside with their pronotum or by biting them.

Attempts to rear either *H. axyridis* or *C. septempunctata* on grapevine leaves without galls resulted in 100% of them dying in the first two instars.

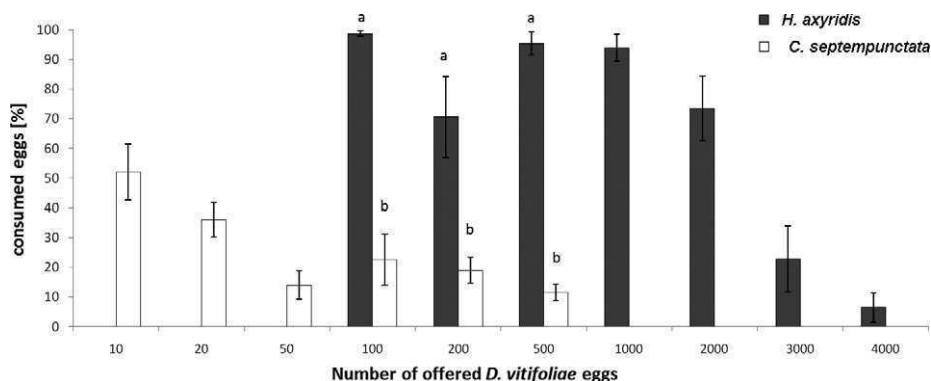


Fig. 2. Consumption (mean %) of *D. vitifoliae* eggs by *H. axyridis* (black) and *C. septempunctata* (white) after 24 h in relation to egg density (100, 200, 500, 1000, 2000, 3000, 4000 eggs for *H. axyridis* and 10, 20, 50, 100, 200, 500 eggs for *C. septempunctata*), $n = 10$. Error bars represent \pm SE. Small letters indicate significant differences in egg consumption ($\alpha = 0.05$; $p < 0.05$; Mann-Whitney-U test).

When provided with a diet of *E. kuehniella* eggs both *H. axyridis* and *C. septempunctata* were able to complete their life cycle. There were significant differences in the developmental parameters of the *H. axyridis* fed on leaf galls compared with those fed *E. kuehniella* eggs ($p < 0.05$; Table 1).

Egg consumption by adult ladybird beetles

H. axyridis consumed significantly more grape phylloxera eggs/ 24 h than *C. septempunctata* ($n = 10$: 100 eggs: $p < 0.001$; 200 eggs: $p < 0.05$; 500 eggs: $p < 0.001$, Fig. 2). For example a total of $71 \pm 14\%$ (mean \pm SE) of the 200 eggs was consumed by *H. axyridis* after 24 h, whereas only $19 \pm 4\%$ was consumed by *C. septempunctata*.

While *H. axyridis* consumed $94 \pm 15\%$ of the 1000 eggs provided within 24 h, this decreased to only $23 \pm 11\%$ when 3000 eggs were provided (Fig. 2).

The consumption of eggs by *C. septempunctata* was always markedly lower. In the treatment with ten eggs a mean reduction of $52 \pm 9\%$ was recorded after 24 h and

they only consumed $12 \pm 3\%$ of the maximum number of eggs offered (500 eggs; Fig. 2).

Field study

The total numbers of adult *H. axyridis* on grapevines with and without leaf galls was significantly different ($p < 0.001$) in both years. In 2010, an average of 2.95 ± 0.88 (mean \pm SE) adult *H. axyridis* per vine (in total 59) was recorded on vines with leaf galls category $\geq 3-5$. In 2011, 11.42 ± 1.40 adults per plant (in total 575) were counted on the same categories. In contrast, only 0.25 ± 0.08 (in total 5) and 0.38 ± 0.12 (in total 19) adults of *H. axyridis* per plant were found on vines with leaf gall category 1-2 in 2010 and 2011, respectively.

The numbers of individuals of *H. axyridis* on leaf galls were significantly different in both years on vines of category 1-2; cat. 3-5; cat. 6-7 and cat. 8-9 ($p < 0.05$; 2011: Fig. 3). The highest abundance of *H. axyridis* was recorded from the end of July until mid-August, when the Phylloxera infestation reached a maximum. Leaf galls were big and abundant during this period. In the following weeks, the number of adults on leaves with leaf galls decreased (Fig. 4).

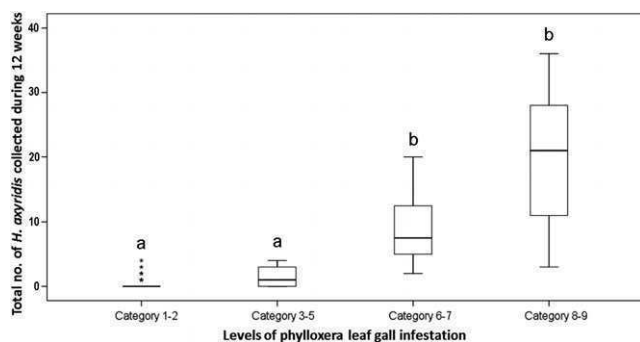


Fig. 3. Number of *H. axyridis* observed between July and September 2011 on grapevines with different levels of infestation with leaf galls of *D. vitifoliae* (50 grapevines for category 1-2, 12 for 3-5, 19 for 6-7 and 19 for 8-9). See Material & Methods for description of categories. Horizontal lines indicate medians, boxes represent the interquartile ranges and the standard deviations. Outliers are indicated by an asterisk. Small letters indicate significant differences between the four categories ($\alpha = 0.05$; $p < 0.05$; Kruskal-Wallis-H-test).

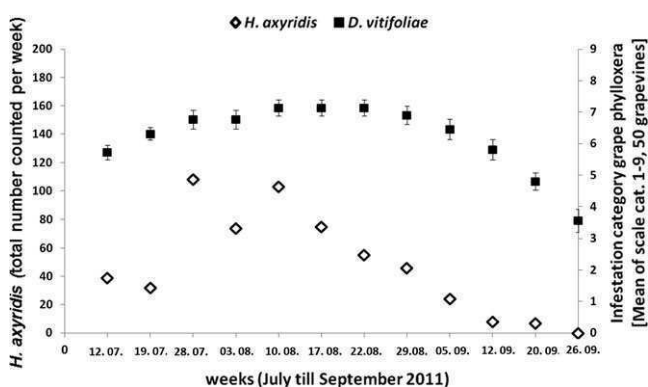


Fig. 4. Counts (total number counted per week) of *H. axyridis* (white rhombus) on grapevines ($n = 50$, cat. $\geq 3-5$) infested with leaf galls of *D. vitifoliae* together with mean number of galls per leaf (mean and SE; ranked in categories 1 to 9; black squares).

There was no correlation between the abundance of *H. axyridis* and the occurrence of mildew, mites or aphids on grapevines. During our observations, we recorded only 9 adults of *C. septempunctata* on grapevine leaves in 2011 and 2 adults in 2010, respectively. Due to the low abundance of this species it was not possible to determine whether it showed a preference for leaves infested with grape phylloxera.

DISCUSSION

The laboratory study showed that *H. axyridis* is able to complete its life cycle by feeding exclusively on *D. vitifoliae*. There was no other suitable food on grapevine leaves because all the larvae on leaves without galls died. However, the developmental time, percentage survival and fresh weight of newly emerged adults (Hodek 1973; Gross et al., 2004; Kalushkov & Hodek, 2004; Pervez & Omkar, 2006) indicate that the quality of *D. vitifoliae* as prey for this ladybird is poor. The measure of prey suitability (SL) recorded in the laboratory was 0.6, which is very low compared to the 2.5 recorded when fed a diet of *E. kuehniella* eggs. The prey suitability of aphids like *Aphis philadelphi*, *A. fabae* or *Dysaphis plantaginea* for this ladybird is >1.5 (Ungerova et al., 2010). Even *A. sambuci* has a prey suitability of 1.1 (Ungerova et al., 2010), although it is known to be a non-optimum food for *H. axyridis* and even toxic for some other ladybird beetles (Omkar & Srivastava, 2003; Nedved & Salvucci, 2008). However, when comparing developmental parameters it is important that the rearing conditions, like photoperiod and type of rearing boxes, are identical. For example, developmental time may be influenced by photoperiod or even the type of rearing box (Ungerova et al., 2010; Reznik & Vaghina, 2011). The rearing conditions used by Ungerova et al. (2010) are similar to those used in this study.

Body weight of adult *H. axyridis* reared on *D. vitifoliae* was significantly lower than that of those fed on *E. kuehniella* eggs. Furthermore, the developmental time was significantly longer and percentage survival less (Table 1). The results obtained in this study for *H. axyridis* fed *E. kuehniella* eggs correspond well with previously published data on developmental time (14–17 d), body weight (25–35 mg) and percentage survival (> 80%) (Abdel-Salam et al., 1997; Specky et al., 2003; Kögel et al., 2012c). Small adults of *Adalia bipunctata* have a lower fecundity and their eggs are less fertile than those of large adults (Hodek, 1973). This might be the same for *H. axyridis*.

Unlike *H. axyridis*, *C. septempunctata* was not able to develop on a diet of grape phylloxera as all the larvae that hatched on leaves with and without leaf galls died.

H. axyridis is able to complete its development feeding on *Toxoptera citricida* and *Aphis spiraecola*, but *C. septempunctata* cannot (Michaud, 2000). This and the above results may indicate that *H. axyridis* is more of a generalist predator than *C. septempunctata*. The pronounced polyphagy of *H. axyridis* and its use of a wide range of aphids is already well known (Koch, 2003; Pervez &

Omkar, 2005; Berkvens et al., 2010). When reared on an optimum diet, such as *E. kuehniella* eggs, the body weight, developmental time and percentage mortality of *C. septempunctata* were comparable to those of *H. axyridis* (Table 1). It is also likely that *H. axyridis* only feeds and reproduces on grape phylloxera in late summer.

Adults of *H. axyridis* consumed more *D. vitifoliae* eggs per unit time than those of *C. septempunctata*. Overall, *H. axyridis* is also well known to be **more voracious in terms of the range of different species of prey [i.e. generalist (as mentioned earlier)?]** it will eat than *C. septempunctata* (Lucas et al., 1997; Finlayson et al., 2009).

At first glance the laboratory results indicate that *H. axyridis* could be a predator of *D. vitifoliae*. However, laboratory results have a limited value for determining the extent of predation under field conditions (O'Neil, 1997). In our study, significantly higher numbers of *H. axyridis* were observed in the field on grapevines with leaf galls than on grapevines without them. This observation might indicate that this ladybird beetle uses one or more life stages of *D. vitifoliae* as prey in the field. Due to no observed site effects and no plant protection, other possible food resources for *H. axyridis* are considered as widely equivalent in our trial (see trial design). Also we observed *H. axyridis* attacking galls in the field. In addition, the occurrence of *H. axyridis* was not correlated with the presence of mildew and/or mites on the grapevines. *C. septempunctata* was rarely found on grape vines infested with grape phylloxera possibly because it is not an attractive prey for the seven-spot-ladybeetle.

The maximum numbers of *H. axyridis* on grapevines with leaf galls was observed at the beginning of August, which is the time when the *D. vitifoliae* leaf galls are most abundant and the majority contain eggs (Forneck & Huber, 2008). Subsequently, grape phylloxera migrates to the roots and few eggs remain in leaf galls and/or the infested leaves are shed (Bessin, 2003; Powell, 2008). This possibly accounts for the decline in the abundance of *H. axyridis* on leaf galls in autumn. Also aphids on other crops (sunflower, maize or sudan grass) are abundant at this time (unpublished data).

H. axyridis has the potential to pollute wine with so called "ladybird taint". The risk is greatest when *H. axyridis* is present in vineyards in late summer when the grapes are ripe. Possibly the beetles migrate to and feed on the ripening grapes when nymphs of *D. vitifoliae* become scarce in September. This did not occur to any great extent in 2010 and 2011 but this needs to be studied in the future.

In conclusion, in the field the invasive *H. axyridis* is a possible predator of *D. vitifoliae*. Even though grape phylloxera is not the optimum food for *H. axyridis*, it may serve as a source of food if other food is rare or lacking in late summer.

ACKNOWLEDGEMENTS. This work was supported by a grant from the "Forschungsring Deutscher Weinbau" (FDW). We are grateful to M. Paulus, C. Emmerling and S. Lötters of Trier University FB VI Geography/Biogeography for coopera-

tion. We thank J. Gross, M. Fischer and M. Maixner, Julius Kühn-Institut, for improvements.

REFERENCES

- ABDEL-SALAM A.H., ELLINGTON J.J., EL-ADL M.A., ABOU EL-NAGA A.M. & GHANIM A.A. 1997: Longevity and fecundity of *Harmonia axyridis* adults reared on an artificial diet and pink bollworm eggs. In: *Proc. 1st National Conf. of Applied Using of Natural Enemies for Controlling Insect and Mite Pests, Mansoura, 4–5 March, 1997, Vol. 1*. pp. 50–57.
- ANONYMOUS 1989: *Richtlinie des Bundessortenamtes für die Durchführung der Prüfungen von Rebsorten auf die Anfälligkeit für die Reblaus*. German Federal Plant Variety Office.
- BERKVEN N., LANDUYT C., DEFORCE K., BERKVEN D., TIRRY L. & DE CLERCQ P. 2010: Alternative foods for the multicoloured Asian lady beetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). — *Eur. J. Entomol.* **107**: 189–195.
- BESSIN R. 2003: *Grape Phylloxera*. Entomology Factsheet 222, University of Kentucky, College of Agriculture, <http://www.ca.uky.edu/entomology/entfacts/entfactpdf/ef222.pdf>
- BOTEZATU A. & PICKERING G.J. 2010: Ladybug (Coccinellidae) taint in wine. In Reynolds A.G.: *Understanding and Managing Wine Quality and Safety*. Woodhead, Cambridge, pp. 418–429.
- FERRAN A., NIKNAM H., KABIRI F., PICART J., DEHERVE C., BRUN J., IPERTI G. & LAPCHIN L. 1996: The use of *Harmonia axyridis* larvae (Coleoptera: Coccinellidae) against *Macrosiphum rosae* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphididae) on rose bushes. — *Eur. J. Entomol.* **93**: 59–67.
- FINLAYSON C., ALYOKHIN A., GROSS S. & PORTER E. 2009: Differential consumption of four aphid species by four lady beetle species. — *J. Insect Sci.* **10**: 1–10.
- FORNECK A. & HUBER L. 2008: (A)sexual reproduction – a review of life cycles of grape phylloxera, *Daktulosphaira vitifoliae*. — *Entomol. Exp. Appl.* **131**: 1–10.
- GALVAN T.L., BURKNESS E.C. & HUTCHISON W.D. 2006: Influence of berry injury on infestations of the multicolored Asian lady beetle in wine grapes. — *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2006-1003-01-RS
- GALVAN T.L., BURKNESS E.C., VICKERS Z., STENBERG P., MANSFIELD A.K. & HUTCHISON W.D. 2007: Sensory-based action threshold for multicolored Asian lady beetle-related taint in winegrapes. — *Am. J. Enol. Viticult.* **58**: 518–522.
- GROSS J., FATOUROS N.E. & HILKER M. 2004: The significance of bottom-up effects for host plant specialization in *Chrysomela* leaf beetles. — *Oikos* **105**: 368–376.
- HILL G. & SCHLAMP H. 1984: Der Einsatz der Waschmethode zur Ermittlung des Raubmilbenbesatzes auf Reblättern. — *Die Weinwissenschaft* **4**: 255–262.
- HODEK I. 1973: *Biology of Coccinellidae*. Academia, Prague, 260 pp.
- HOFFMANN C. 2011: Reblaus-Fachgespräch beim Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau des JKI in Siebelingen. — *J. Cultivated Plants* **63**: 340–343.
- KALUSHKOV P. & HODEK I. 2004: The effects of thirteen species of aphids on some life history parameters of the ladybird *Coccinella septempunctata*. — *Biocontrol* **49**: 21–32.
- KOCH R.L. 2003: The multicolored Asian lady beetle, *Harmonia axyridis*: A review of its biology, uses in biological control, and non-target impacts. — *J. Insect Sci.* **3/32**: 1–16.
- KÖGEL S., HOFFMANN C., GROSS J. & ULRICH D. 2012a: Diversity and frequencies of methoxy-pyrazines in hemolymph of *Harmonia axyridis* and *Coccinella septempunctata* and their influence on the taste of wine. — *Eur. Food Res. Technol.* **234**: 399–404.
- KÖGEL S., GROSS J. & HOFFMANN C. 2012b: Sensory detection thresholds of “ladybird taint” in “Riesling” and “Pinot noir” under different fermentation and processing conditions. — *Vitis* **51**: 27–32.
- KÖGEL S., EBEN A., HOFFMANN C. & GROSS J. 2012c: The influence of diet on fecundity, immune defense and 2-isopropyl-3-methoxy-pyrazine content of *Harmonia axyridis* Pallas (Coleoptera: Coccinellidae). — *J. Chem. Ecol.* **38**: 854–864.
- LUCAS E., CODERRE D. & VINCENT C. 1997: Voracity and feeding preferences of two aphidophagous coccinellids on *Aphis citricola* and *Tetranychus urticae*. — *Entomol. Exp. Appl.* **85**: 151–159.
- MICHAUD J.P. 2000: Development and reproduction of ladybeetles (Coleoptera: Coccinellidae) on the citrus aphids *Aphis spiraecola* Patch and *Toxoptera citricida* (Kirkaldy) (Homoptera: Aphididae). — *Biol. Control* **18**: 287–297.
- NEDVED O. & SALVUCCI S. 2008: Ladybird *Coccinella septempunctata* (Coleoptera: Coccinellidae) prefers toxic prey in laboratory choice experiment. — *Eur. J. Entomol.* **105**: 431–436.
- OMKAR G.M. & SRIVASTAVA S. 2003: Influence of six aphid prey species on development and reproduction of a ladybird beetle, *Coccinella septempunctata*. — *BioControl* **48**: 379–393.
- O’NEIL R. 1997: Functional response and search strategy of *Podisus maculiventris* (Heteroptera: Pentatomidae) attacking Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). — *Environ. Entomol.* **26**: 1183–1190.
- PERVEZ A. & OMKAR G.M. 2006: Ecology and biological control application of multicoloured Asian ladybird, *Harmonia axyridis*: A review. — *Biocontr. Sci. Techn.* **16**: 111–128.
- PICKERING G., KER K. & SOLEAS G. 2007: Determination of the critical stages of processing and tolerance limits for *Harmonia axyridis* for “ladybug taint” in wine. *Vitis* **46**: 85–90.
- POWELL K. 2008: Grape phylloxera: An overview. In Johnson S.N. & Murray P.J. (eds): *Root Feeders: An Ecosystem Perspective*. CAB International, Wallingford, pp. 96–114.
- REZNIK S.Y. & VAGHINA N.P. 2011: Photoperiodic control of development and reproduction in *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). — *Eur. J. Entomol.* **108**: 385–390.
- SEKO T. & MIURA K. 2008: Functional response of the lady beetle *Harmonia axyridis* (Pallas) (Coleoptera: Coccinellidae) on the aphid *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae). — *Appl. Entomol. Zool.* **43**: 341–345.
- SPECTY O., FEBVAY G., GRENIER S., DELOBEL B., PIOTTE C., PEGEAUX J.F., FERRAN A. & GUILLAUD J. 2003: Nutritional plasticity of the predatory ladybeetle *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae): Comparison between natural and substitution prey. — *Arch. Insect Biochem.* **52**: 81–91.
- STEWART L.A., HEMPTINNE J.-L. & DIXON A.F.G. 1991: Reproductive tactics of ladybird beetles: relationships between egg size, ovariole number and developmental time. — *Funct. Ecol.* **5**: 380–385.
- UNGEROVA D., KALUSHKOV P. & NEDVED O. 2010: Suitability of diverse prey species for development of *Harmonia axyridis* and the effect of container size. — *IOBC/WPRS Bull.* **58**: 165–174.
- XUE Y., BAHALAI C., FREWIN A., SEARS M., SCHAAFSMA A. & HALLETT R. 2009: Predation by *Coccinella septempunctata* and *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae) on *Aphis glycines* (Homoptera: Aphididae). — *Environ. Entomol.* **38**: 708–714.

Received April 17, 2012; revised and accepted August 24, 2012

Lebenslauf



Beruf

- Ab 09/2012:** Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Ökotoxikologie bei Dr. Knoell Consult GmbH, Mannheim
- 09/2009 – 08/2012:** Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Julius Kühn-Institut, Institut für Pflanzenschutz in Obst- und Weinbau, Siebeldingen

Promotion:

- 2009 - 2012:** Thema: Risikoabschätzung von *Harmonia axyridis*, dem Asiatischen Marienkäfer, für den deutschen Obst- und Weinbau; Universität Trier, Trier

Studium

- 2005 – 2009:** Biogeographie an der Universität Trier; Fächer: Biogeographie, Bodenkunde, Ökotoxikologie, Geobotanik
- Abschluss:** Diplom-Biogeographin, Note: sehr gut
- Thema der Diplomarbeit:** „Einfluss der Biodiversität von Lumbriciden auf Kenngrößen des Bodenwasserhaushaltes sowie Grab- und Oberflächenaktivität“
- 2007:** Auslandssemester an der Universidade de Caxias do Sul, Brasilien

Schulbildung

- 1995 - 2004:** Gymnasium „Leininger Gymnasium“, Grünstadt;
- Abschluss:** Abitur; Note: 1,8
- 1991 - 1995:** Grundschule „Am Atzenberg“, Carlsberg

