

Untersuchungen zur Infektionsbiologie und Heritabilität von
Infektionsparametern entomopathogener Nematoden
bei Larven der Maikäfer (*Melolontha* spp.) sowie zur
Charakterisierung der Nematoden durch DNA-Fingerprinting

Martin Berner

2003

INAUGRIAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Martin Berner
aus Eppingen

Tag der mündlichen Prüfung:

Für meine Eltern

Danksagung

Prof. Dr. Werner A. Müller (Zoologisches Institut der Universität Heidelberg) für die Betreuung und das Interesse an meiner Arbeit sowie seine Diskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. Michael Wink (Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Heidelberg) für die Übernahme des Korreferats.

Dr. Wolfgang Schnetter für die Überlassung des Arbeitsplatzes und seine stetige Diskussionsbereitschaft in allen Belangen meiner Arbeit.

Dr. Ralf-Udo Ehlers (Phytopathologisches Institut der Universität Kiel) für die gute Kooperation, die Überlassung von Nematoden-Stämmen und seine Diskussionsbereitschaft.

Dr. Olaf Strauch, dem Doktoranden Stefan Johnigk (Phytopathologisches Institut der Universität Kiel) und Dr. Arne Peters (E-Nema, Raisdorf) für zahlreiche Diskussionen und wertvolle Tipps bei der Handhabung von Nematoden und bei verschiedenen Berechnungen.

Prof. Dr. Lutz Schüler (Institut für Tierzucht und Tierhaltung der Universität Halle-Wittenberg) für wertvolle Hinweise bei den Berechnungen zur Heritabilität und das kritische Gegenlesen entsprechender Passagen.

Dr. Jens Treutlein (Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Heidelberg) für wertvolle Tipps bei der Erstellung der Dendrogramme und seine Diskussionsbereitschaft.

Dr. Renate Radek (jetzt Institut für Biologie, Arbeitsbereich Zoologie, Freie Universität Berlin) für Ratschläge für den Umgang mit Rickettsien und die Hilfe bei der Bedienung des Elektronenmikroskops.

Dr. Kerstin Jung (Biologische Bundesanstalt Darmstadt) für die Überlassung der Reagenzien zur Bestimmung des Lipidgehaltss der Nematoden und Ratschläge zu deren Handhabung.

Dr. Albrecht Koppenhöfer (Rutgers University, New Brunswick, USA) für einige nutzbringende Diskussionen und die Überlassung von Nematoden-Stämmen.

Prof. Dr. Dr. German Müller und Dr. Alfred Yahya (Institut für Umwelt und Geochemie der Universität Heidelberg) für die Hilfe bei der Charakterisierung der Bodentypen.

Den ehemaligen Mitdoktoranden Dr. Wolfgang Wagner und Dr. Lutz Krieger für die Hilfe bei der Beschaffung von Tiermaterial und ihre Diskussionsbereitschaft.

Den Examenskandidaten Oliver Abel und Stefanie Hitzel für die gute Zusammenarbeit im Labor. Der Arbeitsgruppe von Dr. Uri Frank, besonders der Doktorandin Regina Mei Mei Teo, für zahlreiche Diskussionen und die Kooperation bei der Etablierung der ISSR-PCR.

Dem Ministerium für Ernährung und ländlichen Raum des Landes Baden-Württemberg und der Landesanstalt für Pflanzenschutz in Stuttgart für die finanzielle Förderung der Arbeitsgruppe.

Dem Land Baden-Württemberg für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit durch ein Stipendium nach dem Landesgraduiertenförderungsgesetz.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Ziele der Arbeit.....	2
1.2 Entomopathogene Nematoden (EPN).....	3
1.2.1 Lebenszyklus.....	4
1.2.2 Massenvermehrung	4
1.2.3 Stellenwert der EPN in der biologischen Schädlingsbekämpfung.....	6
1.2.4 Aktuelle Forschung an EPN.....	6
1.3 Der Maikäfer und verwandte Arten.....	7
1.3.1 Bedeutung als Schädling	7
1.3.2 Bekämpfung des Maikäfers.....	8
2. Material und Methoden	9
2.1 Herkunft und Haltung der Insekten.....	9
2.1.1 Larven des Maikäfers und verwandter Käferarten	9
2.1.2 Große Wachsmotte (<i>Galleria mellonella</i>).....	10
2.1.3 Mehlkäfer (<i>Tenebrio molitor</i>)	10
2.2 Herkunft und Haltung der Nematoden.....	11
2.2.1 Vermehrung der Nematoden	11
2.2.2 Aufbereitung der Nematoden-Suspension	11
2.2.3 Zählen der Nematoden und Einstellung der Suspension.....	12
2.2.4 Lagerung der Nematoden	12
2.2.5 Oberflächensterilisation von Nematoden	14
2.2.6 Erzeugung von Inzuchtlinien	14
2.2.7 Kreuzung von <i>Steinernema</i> -Stämmen.....	15
2.2.8 Messung des Lipidgehalts der Nematoden.....	15
2.3 Biotests.....	16
2.3.1 Charakterisierung der verwendeten Bodensubstrate	16
2.3.2 Testsystem I.....	17
2.3.3 Testsystem II	17
2.3.4 Orale Injektion der Nematoden	18
2.3.5 Hämocoeale Injektion der Nematoden	18
2.3.6 Isolierung der symbiotischen Bakterien	19
2.3.7 Aufbereitung der Bakteriensuspension und Injektion	20
2.4 Untersuchung des Infektionsverhaltens und der Penetrationsroute.....	20
2.4.1 Wanderaktivität auf Agarplatten	20
2.4.2 Wanderaktivität, Wirtsfindung und -präferenz in Sandröhren.....	21
2.4.3 Exposition des Mundes oder des Anus	21
2.4.4 Gewinnung von Darmsaft und Hämolymphe aus Insektenlarven.....	22
2.4.5 Bestimmung der Phenoloxidasen-Aktivität von Hämolymphe.....	23
2.5 Modelle zur Beschreibung des Infektionsverhaltens	23
2.5.1 Modelle zur Beschreibung der Infektionsdynamik der Nematoden.....	23
2.5.2 Modelle zur Beschreibung der Befallsstrategie der Nematoden.....	25

2.6	Selektion auf höhere Infektiosität und Bestimmung der Heritabilität.....	27
2.6.1	Allgemeine Definitionen.....	27
2.6.2	Berechnung der Heritabilität aus den Selektionsversuchen.....	29
2.6.3	Berechnung der Heritabilität aus Versuchen mit Inzuchtlinien.....	30
2.6.4	Berechnung der umweltbedingten Korrelation von Merkmalen.....	31
2.7	Statistik.....	31
2.7.1	Allgemeines.....	31
2.7.2	Berechnung der LD- und LT-Werte.....	32
2.8	Molekulare Methoden.....	34
2.8.1	DNA-Isolierung aus einem Nematoden-Pool.....	34
2.8.2	DNA-Isolierung aus Einzelnematoden.....	34
2.8.3	Konzentrationsbestimmung der DNA.....	35
2.8.4	Allgemeines zur PCR.....	35
2.8.5	RAPD-PCR (<i>Random amplified polymorphic DNA – PCR</i>).....	36
2.8.6	ISSR-PCR (<i>Inter simple sequence repeats – PCR</i>).....	37
2.8.7	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	39
2.8.8	Ligation.....	41
2.8.9	Transformation und Blau/Weiß-Selektion.....	41
2.8.10	Isolierung von Plasmiden (Minipräp).....	42
2.8.11	Sequenzierung.....	43
2.8.12	Agarose-Gelelektrophorese.....	44
2.8.13	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (dPAGE).....	45
2.8.14	Datenanalyse.....	47
3.	Ergebnisse.....	50
3.1	Screening verschiedener Nematodenarten und -stämmen.....	50
3.2	Wirksamkeit der Nematoden bei Rickettsien-Befall der Engerlinge.....	52
3.3	Infektionsbiologie I – LD₅₀-Bestimmungen.....	55
3.3.1	Infektiosität bei externer Applikation.....	56
3.3.2	Infektiosität der Nematoden nach Injektion.....	62
3.3.3	Hämocoelale Injektion der symbiotischen Bakterien.....	66
3.4	Infektionsbiologie II – Infektionsverhalten und Penetrationsroute.....	66
3.4.1	Wanderaktivität, Wirtsfindung und -präferenz der Nematoden.....	66
3.4.2	Infektionsdynamik und Penetrationsroute bei externer Applikation.....	70
3.4.3	Resistenz gegenüber dem Abwehrsystem von <i>M. melolontha</i> -Larven.....	79
3.4.4	Das Vermehrungspotential der Nematoden in verschiedenen Insektenlarven.....	83
3.4.5	Modelle zur Beschreibung der Befallsstrategie.....	84
3.4.6	Intraspezifische Konkurrenz.....	91
3.5	Selektion auf höhere Infektiosität.....	95
3.5.1	Selektionsverlauf, realisierte Heritabilität und phänotypische Korrelation.....	95
3.5.2	Merkmale des Nematoden-Bakterien-Komplexes während der Selektion.....	106
3.6	Vergleichende Untersuchungen an Inzuchtlinien.....	110
3.6.1	Heritabilität.....	110
3.6.2	Umweltbedingte Korrelation von Merkmalen.....	114

3.7 Molekularbiologische Untersuchungen.....	116
3.7.1 RAPD-PCR	116
3.7.2 ISSR-PCR.....	119
3.7.3 Gegenüberstellung der RAPD- und ISSR-PCR-Analysen.....	125
3.7.4 Sequenzierung der DNA einzelner Banden aus der ISSR-PCR-Analyse	127
4. Diskussion.....	129
4.1 Screening verschiedener Nematodenarten und –stämmen.....	129
4.1.1 Verwandte des <i>S. glaseri</i> in Europa	129
4.1.2 Generalisten und Spezialisten – Vergleich <i>S. feltiae</i> und <i>S. glaseri</i>	130
4.1.3 <i>H. bacteriophora</i> als natürlicher Gegenspieler des Mai- und Junikäfers.....	131
4.1.4 Generalisten oder Spezialisten? Vergleich <i>H. bacteriophora</i> und <i>H. megidis</i>	132
4.1.5 Der Feld- und der Waldmaikäfer sind unterschiedlich anfällig	132
4.1.6 Die Problematik der Nachweismethode entomopathogener Nematoden.....	133
4.2 Wirksamkeit der Nematoden bei Rickettsien-Befall der Engerlinge	135
4.2.1 Die Vorinfektion durch Rickettsien erhöhte die Wirksamkeit der Nematoden ...	135
4.2.2 Die Reproduktionsrate der Nematoden wurde durch die Konkurrenz der Rickettsien reduziert.....	136
4.2.3 Die Fitness („Qualität“) der Nematoden nach Vermehrung in einer Larve mit Rickettsien-Infektion ist vermindert.....	137
4.2.4 Eine Verschleppung der Rickettsien durch die Nematoden ist möglich, zu einer Rickettsien-Infektion kam es jedoch nicht	138
4.3 Infektionsbiologie I – LD₅₀-Bestimmungen.....	140
4.3.1 Vergleich der Modelle zur LD ₅₀ -Bestimmung.....	140
4.3.2 Die LD ₅₀ bei externer Applikation und oraler Injektion der Nematoden ist bei <i>H. bacteriophora</i> sehr viel größer als bei <i>S. glaseri</i>	141
4.3.3 Die LD ₅₀ bei hämocoaler Injektion der Nematoden und der symbiotischen Bakterien ist bei <i>H. bacteriophora</i> sehr viel kleiner als bei <i>S. glaseri</i>	142
4.3.4 Die Virulenz der symbiotischen Bakterien	142
4.3.5 Der hohe Anteil kleiner Kornfraktionen ($\varnothing < 20 \mu\text{m}$) im Bodensubstrat „Lehm“ dürfte für die reduzierte Wirksamkeit der Nematoden verantwortlich sein.....	144
4.4 Infektionsbiologie II – Infektionsverhalten und Penetrationsroute	145
4.4.1 <i>H. bacteriophora</i> und <i>S. glaseri</i> sind Pirschjäger, ihre Wanderaktivität und Wirtsfindung unterscheiden sich jedoch deutlich	145
4.4.2 Infektionsdynamik bei externer Applikation.....	147
4.4.3 Gibt es eine phasenweise Infektiosität der Dauerlarvenpopulation?	149
4.4.4 Die Penetrationsroute bei <i>M. melolontha</i> -Larven (<i>in vivo</i>).....	153
4.4.5 <i>H. bacteriophora</i> penetriert bevorzugt über den Mund, während <i>S. glaseri</i> die Route über den Anus bevorzugt.....	154
4.4.6 Die Möglichkeit einer direkten Penetration der Kutikula in intersegmentalen Bereichen ist für <i>H. bacteriophora</i> nicht auszuschließen	155
4.4.7 Dauerlarven von <i>H. bacteriophora</i> sind relativ anfällig gegenüber Darmsaft und Hämolymphe von <i>M. melolontha</i> -Larven, <i>S. glaseri</i> ist weitgehend resistent	156
4.4.8 Bei L2-Larven von <i>M. melolontha</i> war die Phenoloxidase-Aktivität geringer....	157
4.4.9 Das Vermehrungspotential in verschiedenen Insektenlarven	159
4.4.10 Modelle zur Beschreibung der Befallsstrategie	162
4.4.11 Modell zu Beschreibung intraspezifischer Konkurrenz	164

4.5	Selektion auf höhere Infektiosität.....	166
4.5.1	Exo- und endogene Faktoren sorgen bei <i>H. bacteriophora</i> dafür, dass jeweils nur ein Teil der Dauerlarvenpopulation in einem „infektiösem Zustand“ ist.....	167
4.5.2	<i>S. glaseri</i> agiert eher nach dem „Alles-oder-Nichts“-Prinzip	169
4.5.3	Die Eigenart der Befallsstrategie von <i>H. bacteriophora</i> verhinderte die Stabilisierung einer höheren Infektiosität durch Selektion	169
4.5.4	Die Befallsstrategie von <i>S. glaseri</i> erlaubte die sukzessive Erhöhung der Selektionsintensität und führte zur Stabilisierung einer höheren Infektiosität	170
4.5.5	Ein direkter Vergleich der realisierten Heritabilitäten ist nur bedingt möglich...	171
4.5.6	Wurde ein Selektionsplateau erreicht?.....	171
4.5.7	Kam es während der Selektion zu Inzuchtdepressionen? Als Kriterium wurde das Vermehrungspotential der Selektionslinien untersucht.....	173
4.5.8	Die einmalige Vermehrung in <i>M. melonantha</i> -Larven bewirkte bereits eine Wirkungssteigerung	175
4.5.9	Die Selektion führte bei <i>S. glaseri</i> zu längeren Dauerlarven.....	176
4.5.10	<i>S. glaseri</i> zeigt eine große phänotypische Varianz der Länge der Dauerlarven ..	177
4.5.11	<i>S. glaseri</i> zeigt ernährungsphysiologische Anpassungen an Scarabaeiden-Larven, eine Schlüsselrolle kommt den Lipiden zu	179
4.5.12	Für <i>H. bacteriophora</i> ist der Umfang des Fettdepots weniger variabel.....	180
4.5.13	Die Bedeutung der symbiotischen Bakterien	180
4.5.14	Die realisierte Heritabilität für das Vermehrungspotential ist nahezu null	183
4.5.15	Aus ökologischer Sicht ist die Befallsstrategie beider Nematodenarten auf langfristiges Überleben der Art optimiert	184
4.5.16	Wie müsste ein Selektionsprogramm auf höhere Infektiosität aussehen?	185
4.6	Vergleichende Untersuchungen an Inzuchtlinien	187
4.6.1	Zur Berechnung der Heritabilität bei Inzuchtlinien	187
4.6.2	Die Werte für die Heritabilität der Infektiosität und der Penetrationsaktivität sind relativ hoch.....	192
4.6.3	Das Vermehrungspotential im Insekt (<i>in vivo</i>) hatte die höchste Umweltvarianz	194
4.6.4	Vermehrungspotential und <i>recovery</i> in Flüssigkultur (<i>in vitro</i>).....	194
4.6.5	Mögliche Folgen der Vermehrung in Flüssigkultur	195
4.6.6	Vergleichbare Untersuchungen an <i>C. elegans</i>	196
4.6.7	Umweltbedingte Merkmalskorrelationen.....	197
4.6.8	Ausblick	199
4.7	Molekularbiologische Untersuchungen.....	201
4.7.1	Vergleich der genetischen Distanzen und Erstellung von Dendrogrammen.....	201
4.7.2	Vergleich mit den Ergebnissen weiterer DNA- <i>Fingerprinting</i> -Methoden	204
4.7.3	Vergleich mit phylogenetischen Studien.....	205
4.7.4	Unterscheidung der Re-Isolate, Inzuchtlinien und Selektionslinien	206
4.7.5	Die im Freiland isolierten <i>Heterorhabditis</i> -Stämme „MB1“ und „MB2“	208
4.7.6	Einordnung der <i>Steinernema</i> -Stämme „E“ und „Marokko Devil“	210
4.7.7	Beurteilung der Reproduzierbarkeit der Methoden.....	211
4.7.8	Sequenzierung ausgewählter PCR-Produkte.....	213
5.	Zusammenfassung	216
6.	Summary	218
7.	Literatur	220
8.	Anhang.....	235

1. Einleitung

Alternative Methoden zum Einsatz chemischer Pflanzenschutzmittel in Land- und Forstwirtschaft, aber auch im Kleingartenbereich, gewinnen dank eines gestiegenen Umweltbewusstseins in der Bevölkerung zunehmend an Bedeutung. Diese Methoden umfassen auch den Einsatz natürlicher Gegenspieler wie Fraßfeinde, Parasiten und mikrobielle Krankheitserreger, mit dem Ziel die Population von Schadinsekten bis unterhalb der Schadensschwelle zu reduzieren. Als Sammelbegriff für diese Methoden hat sich die Bezeichnung „biologische Schädlingsbekämpfung“ etabliert. Eine wichtige Voraussetzung des Einsatzes natürlicher Gegenspieler und mikrobiologischer Produkte ist deren Massenzucht. Die Massenzucht ist gekoppelt mit einer stetigen Verbesserung geeigneter Zuchtmethoden und Möglichkeiten der Qualitätskontrolle (Bigler, 1989). Ein entscheidendes Ziel ist dabei die Erhaltung der Virulenz und damit der Wirksamkeit der Gegenspieler. Die Auswahl geeigneter Gegenspieler ist häufig durch deren Wirtsspezifität eingeschränkt. Eine Erweiterung des „Sortiments“ an Gegenspielern für bestimmte Schädlinge erfordert daher die eingehende Untersuchung der Verhältnisse in natürlichen Schädlings-Populationen. Neu entdeckte Gegenspieler erfordern umfangreiche Laboruntersuchungen, um deren Wirtsspezifität und Wirkbedingungen genau zu charakterisieren. Eine weitere Möglichkeit zur Erweiterung und Verbesserung des Sortiments einsatzfähiger Gegenspieler ist die Erhöhung der Wirksamkeit und der Fitness der Gegenspieler durch Selektion und durch Kreuzungen verschiedener Stämme (Hoy, 1986). Eine Überprüfung der genetischen Stabilität der verbesserten Eigenschaften der Gegenspieler und Wirksamkeitstests unter Freilandbedingungen sind dann die nächsten Schritte, die schließlich zu einem „marktfähigen“ Produkt führen sollen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Infektionsbiologie, den Möglichkeiten zur Verbesserung der Wirksamkeit durch Selektion, der Abschätzung der Vererblichkeit ausgewählter Merkmale und der genetischen Charakterisierung entomopathogener Nematoden der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema* für den potentiellen Einsatz zur biologischen Bekämpfung von Larven des Maikäfers (*Melolontha* spp.).

1.1 Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit sollte geprüft werden, inwieweit entomopathogene Nematoden der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema* zur biologischen Schädlingsbekämpfung von Larven des Maikäfers geeignet sind. Dabei sollten eine Reihe von Nematoden-Stämmen auf Wirksamkeit bei diesen Larven getestet und die Möglichkeit der Steigerung der Infektiosität der Nematoden durch Selektion über Wirtspassagen geprüft werden. Die Möglichkeit einer Selektion über Wirtspassagen zur Steigerung der Infektiosität wurde bei entomopathogenen Nematoden bisher relativ selten untersucht und meist nur am Erfolg oder Misserfolg der Selektion gemessen. Ein Verständnis des phänomenologischen Resultats einer Selektion erfordert jedoch eine eingehende Untersuchung der Infektionsbiologie der Nematodenart bei dem jeweiligen Insekt sowie die Abschätzung von phänotypischen und genotypischen Varianzen von Merkmalen der Nematoden, die für einen Infektionserfolg entscheidend sind (Infektionsparameter).

Ziel der Arbeit war es deshalb, die Wirkung der Selektion durch eine parallele Untersuchung der Infektionsbiologie zu erklären. Dabei sollten die phänotypischen und genotypischen Varianzen ausgewählter Infektionsparameter abgeschätzt werden, um dadurch ein Maß für die Heritabilität dieser Parameter zu erhalten. Die Abschätzung dieser Parameter sollte direkt durch Selektion über Wirtspassagen bei Larven des Maikäfers vergleichend an zwei Nematodenarten durchgeführt werden. Eine weitere Abschätzung der Heritabilität und der phänotypischen Korrelation von Infektionsparametern sollte durch vergleichende Untersuchungen an Nematoden-Inzuchtlinien, bei denen Larven des Mehlkäfers (*Tenebrio molitor*) als Wirtsinsekt benutzt wurden, erreicht werden.

Die Nematoden-Stämme innerhalb einer Art lassen sich nicht morphologisch differenzieren. Um die getesteten Nematoden-Stämme sowie die Selektionslinien und Inzuchtlinien differenzieren zu können und die genetischen Distanzen zwischen und innerhalb der Arten abzuschätzen, sollten zwei DNA-Fingerprinting-Methoden (RAPD-PCR und ISSR-PCR) angewandt und verglichen werden. Die Anwendung dieser Methoden sollte klären, ob genetische Veränderungen der Nematoden nach mehreren Selektionspassagen sowie nach einigen Generationen unter Freilandbedingungen nachweisbar sind und inwieweit die genetischen Distanzen mit phänotypischen Merkmalsausprägungen korrelieren. Hierfür waren zunächst grundlegende Untersuchungen notwendig, da geklärt werden musste, ob und inwieweit die ISSR-PCR-Methode zur Unterscheidung von Arten und Stämmen bei entomopathogenen Nematoden geeignet ist.

1.2 Entomopathogene Nematoden (EPN)

Unter den zahlreichen Insekten-parasitären Nematodenarten erlangten Vertreter der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema* als einzige eine größere Bedeutung in der biologischen Bekämpfung von Insekten (Ehlers, 2001). Als Sammelbegriff für beide Gruppen hat sich – auch im deutschen Sprachgebrauch – die Bezeichnung „Entomopathogene Nematoden“ (EPN) etabliert. Die erste Art der Steinernematidae wurde 1923 durch Gotthold Steiner beschrieben, während die Erstbeschreibung der Heterorhabditidae 1976 durch George O. Poinar Jr. erfolgte (Poinar, 1976). Gegenwärtig sind etwa 25 Arten aus der Familie der Steinernematidae und 9 Arten aus der Familie der Heterorhabditidae beschrieben (Hominick *et al.*, 2001); weitere Artbeschreibungen sind zu erwarten. Eine auffällige Gemeinsamkeit aller EPN ist deren enge Assoziation mit symbiotischen Bakterien, die der Gamma Unterabteilung innerhalb der Enterobacteriaceae zugerechnet werden (Ehlers, 2001). Arten der Heterorhabditidae sind mit Bakterien der Gattung *Photorhabdus* und Arten der Steinernematidae mit Bakterien der Gattung *Xenorhabdus* assoziiert. Von beiden Bakterien-Gattungen werden mehrere Arten und Unterarten unterschieden, die jeweils spezifisch mit einer oder mehreren Nematodenarten assoziiert sind (Boemare *et al.*, 1993; Boemare, 2001). Phylogenetische Studien, basierend auf Sequenzvergleichen von 18S rRNA-Genen (Liu *et al.*, 1997) und morphologischen Merkmalen (Poinar, 1993; Sudhaus, 1993), weisen darauf hin, dass beide Nematodengruppen unterschiedlichen monophyletischen Gruppen entstammen; der ähnliche Lebenszyklus (Abb. 1.2) scheint daher auf Konvergenz zu beruhen.

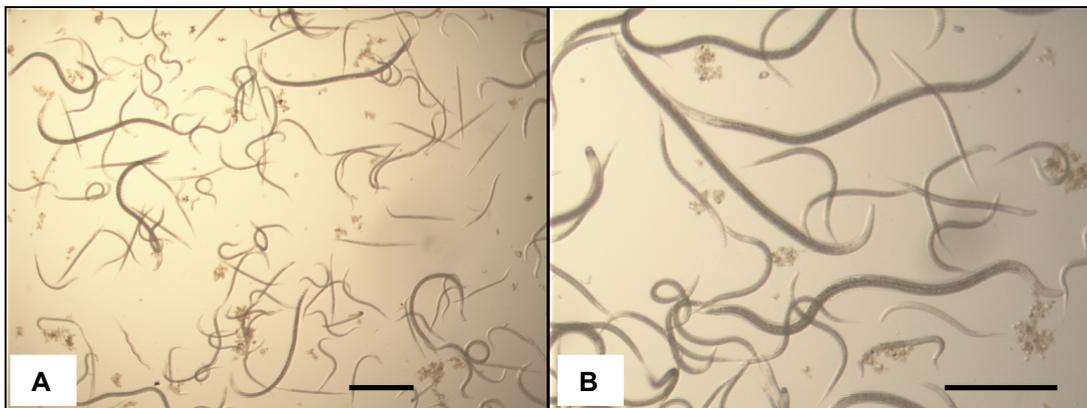


Abb. 1.1. Dauerlarven der in dieser Arbeit untersuchten Nematodenarten *H. bacteriophora* (klein) und *S. glaseri* (groß) im direkten Vergleich bei 25facher (A) und 50facher (B) Vergrößerung (Maßstab jeweils 500 µm).

1.2.1 Lebenszyklus

Der Lebenszyklus der Heterorhabditidae und Steinernematidae ist sehr ähnlich (Abb. 1.2). Das dritte Larvenstadium ist die freilebende Form der Nematoden und entspricht dem bei allen Arten der Rhabditida vorkommenden Stadium der Dauerlarve (DL; engl. *dauer juvenile* oder auch *infective juvenile*). Die Dauerlarven können längere Zeit im Boden überleben. Alle anderen Stadien (erstes, zweites und viertes Larvenstadium sowie erwachsene Nematoden) finden sich ausschließlich im befallenen Insekt. Die Dauerlarven dringen aktiv in ein Insekt ein und geben ihre symbiotischen Bakterien, die sie in ihrem Darm mit sich führen, in die Hämolymphe des Insekts ab. Die Bakterien töten das Insekt und dienen, neben dem verdauten Insektenkadaver selbst, als Nahrung für die sich nun entwickelnden Nematoden. Der Entwicklungsstart (d.h. Nahrungsaufnahme, Wachstum und Häutung) der Dauerlarve wird durch noch nicht bekannte Signale (engl. *food signals*) ausgelöst (Strauch & Ehlers, 1998) und in Analogie zu *C. elegans* als „*recovery*“ bezeichnet (Riddle *et al.*, 1997). Bei den Heterorhabditidae entsteht aus der Dauerlarve ein Zwitterweibchen (Hermaphrodite), das seine Eier selbst befruchtet. Erst in den nächsten Generationen entstehen männliche und weibliche Nematoden (und zum Teil erneut Hermaphroditen). Bei den Steinernematidae sind bereits die Dauerlarven geschlechtlich differenziert und entwickeln sich zu erwachsenen Männchen bzw. Weibchen, es findet also ausschließlich geschlechtliche Vermehrung statt. Wenn die Nematoden-Dichte im Insekt ein bestimmtes Maß überschreitet, wandern schließlich die neuen Dauerlarven aus dem Insektenkadaver aus und der Zyklus beginnt von neuem.

1.2.2 Massenvermehrung

EPN lassen sich relativ leicht auf künstlichen Medien vermehren. Für eine erfolgreiche Vermehrung der EPN ist Voraussetzung, dass die symbiotischen Bakterien im Medium vorkultiviert werden und keine Kontaminationen auftreten (sogenannte *monoxenische* Kultur, d.h. nur der Nematode und sein bakterieller Symbiont sind in Kultur) (Dunphy & Webster, 1989; Lunau *et al.*, 1993). Keimfreie Nematodenlarven erhält man durch Isolierung und Oberflächensterilisierung von Nematodeneiern. Im einfachsten Fall wird eine Agaroseplatte aus einem Standard-Bakterien-Medium, dem etwas pflanzliches Öl zugesetzt wurde (= Wouts-Agar; Wouts, 1981), als Medium verwendet. Für die kommerzielle Produktion haben sich zwei Verfahren etabliert: Kultur auf einem dreidimensionalen Mediumträger (Polyether-Polyurethan-Flocken) (Bedding, 1981, 1984) und Kultur im Flüssigmedium (Lunau *et al.*, 1993). Beide Verfahren werden von führenden Firmen angewandt, wobei sich letzteres mehr

und mehr durchsetzt (Ehlers, 2001). Die Flüssigkultur wird heute in bis zu 3000 l fassenden Bioreaktoren mit computergesteuerter Prozessoptimierung durchgeführt (Ausbeuten je nach Nematodenart von 20000-300000 DL/ml).

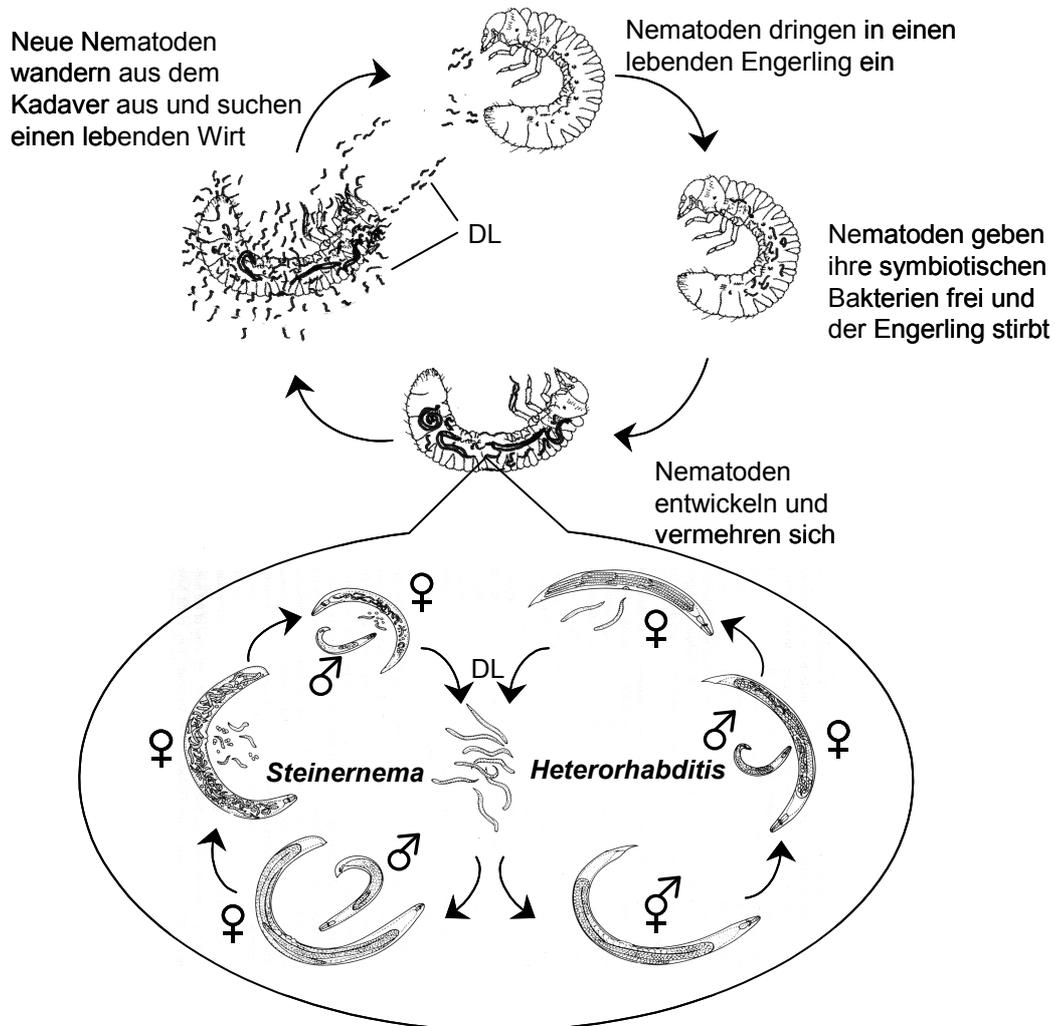


Abb. 1.2. Allgemeiner Lebenszyklus entomopathogener Nematoden der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema*, dargestellt am Beispiel eines Engerlings als Wirt. DL = Dauerlarven der Nematoden. Kombiniert und verändert aus Poinar (1990) und Tanada & Kaya (1993).

Ein interessanter Aspekt der Vermehrungsweise der Nematoden in Flüssigkultur ist, dass Arten von *Heterorhabditis* wegen mechanischer Störungen durch das notwendige Rühren nicht kopulieren können; die Vermehrung erfolgt demnach ausschließlich über selbstbefruchtende Hermaphroditen (siehe Abb. 1.2) (Strauch *et al.*, 1994). Für Arten von *Steinernema* trifft diese Einschränkung aufgrund eines anderen Paarungsverhaltens (die Männchen schlingen sich fest um die Weibchen) nicht zu (Ehlers, 2001).

1.2.3 Stellenwert der EPN in der biologischen Schädlingsbekämpfung

Die biologische Schädlingsbekämpfung im Pflanzenschutzsektor hat in Europa gegenwärtig einen Anteil von rund 2%. Von den biologischen Präparaten entfallen rund 40% auf „Nützlinge“ (z.B. Schlupfwespen, Florfliegen, Raubmilben), etwa 52% auf mikrobiologische Produkte (z.B. *Bacillus thuringiensis*, Granulose-Viren, entomopathogene Pilze wie *Beauveria*), 7% auf natürliche Wirkstoffe auf Pflanzenbasis (z.B. Extrakte von *Reynoutria*) und etwa 2% auf EPN (Blum, 2001). Für die nächsten 10-15 Jahre wird eine Zunahme des Anteils an biologischen Präparaten auf etwa 7% des Gesamtpflanzenschutzmarktes erwartet. EPN kommen bevorzugt in einigen speziellen Kulturen mit sehr guten Erfolgen zum Einsatz: Im Zierpflanzen- und Erdbeeranbau gegen Larven des Gefurchten Dickmaulrüsslers (Coleoptera: Curculionidae, *Otiorhynchus sulcatus*) und verschiedene Wurzelbohrer (Lepidoptera: Hepialidae), im Hopfenanbau gegen Larven des Hopfendickmaulrüsslers (*O. ligustici*), im Anbau von Pilzen (Champignons) gegen Larven von Trauermücken (Diptera: Sciaridae, z.B. *Lycoriella solani*) und Buckelfliegen (Diptera: Phoridae, z.B. *Megaselia halterata*), im Gemüseanbau gegen Larven von Kohlfiegen (Diptera: Anthomyiidae, z.B. *Delia radicum*) und auf Rasenflächen (z.B. Golfplätzen) gegen Larven des Gartenlaubkäfers (Coleoptera: Scarabaeidae, *Phyllopertha horticola*) (z.B. Ehlers, 2001; Richardson, 2001).

1.2.4 Aktuelle Forschung an EPN

Ein aktueller Schwerpunkt in der Forschung an EPN liegt im Technologietransfer von *C. elegans* auf EPN, z.B. Erzeugung transgener Nematoden, Anwendung der RNAi-Methode (= RNA *interference*) sowie in vergleichenden Studien zu *C. elegans*, wie Homologie von Gensequenzen, Vergleich der Expressionsmuster ausgewählter Gene durch die Methode der *Expressed sequenced tag* (EST) (Hashmi *et al.*, 1998; Fodor, 2001; Jones *et al.*, 2001).

Als molekularer Virulenzfaktor des symbiotischen Bakteriums *Photorhabdus luminescens* konnte ein toxischer Protein-Komplex identifiziert werden; die Sequenzen der verantwortlichen Gene sind bereits bekannt (Blackburn *et al.*, 1998; Bowen *et al.*, 1998; French-Constant & Bowen, 1999). In Biotests erwies sich der Protein-Komplex sowohl nach oraler als auch nach hämocoaler Injektion gegen ein breites Spektrum an Insekten als wirksam. Bei beiden Behandlungen waren ähnliche Wirkungen zu beobachten wie bei δ -Endotoxinen und vegetativen insektiziden Proteinen (*Vegetative insecticidal protein* – Vip) von *Bacillus thuringiensis* (z.B. eine beschleunigte Ablösung des Mitteldarmepithels in das Darmlumen und zum Teil eine Lyse des Epithels). Diskussionen um den Einsatz dieser Toxine als Alternativen zu *Bacillus thuringiensis*-Toxinen sind bereits entfacht.

Weitere aktuelle Forschungen konzentrieren sich auf die Charakterisierung molekularer Interaktionen der zwei Symbionten (Bakterium und Nematode) sowie der Phylogenie der Symbiose (Liu *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2001; Boemare, 2001; Adams, 2001; Szállas *et al.*, 2001). Im anwendungsorientierten Bereich werden Forschungen zur Optimierung der Flüssigkultur (Ehlers, 2001), der Zuchtwertschätzung und Selektion der Nematoden (Johnigk *et al.*, 2002) sowie zur Erweiterung des Anwendungsbereichs (z.B. Anwendung auf Blättern mit Hilfe eines Gelträgers; Navon *et al.*, 2000) durchgeführt.

1.3 Der Maikäfer und verwandte Arten

Der Lebenszyklus des Feldmaikäfers (Coleoptera: Scarabaeidae, *Melolontha melolontha* L.) und des nahe verwandten Waldmaikäfers (*M. hippocastani* F.) ist in Abb. 1.3 schematisch dargestellt. Der gesamte Entwicklungszyklus vom Ei über die drei Larvenstadien bis zum Käfer dauert 3-4 Jahre; alle 3-4 Jahre treten daher sogenannte „Flugjahre“ auf (Schwenke, 1974). Der Junikäfer (*Amphimallon solstitialis* L.) hat einen 2-jährigen Entwicklungszyklus. Die Larven aller Scarabaeidae werden gemeinhin als Engerlinge bezeichnet.

1.3.1 Bedeutung als Schädling

Der durch die Käfer verursachte Blattfraß („Reifungsfraß“) an Laubbäumen (Eichen, Ahorn, Obstbäume) ist wirtschaftlich meist vernachlässigbar. Wirtschaftlich weitaus bedeutender sind die durch den Wurzelfraß der Engerlinge hervorgerufenen Schäden. Der Waldmaikäfer verursacht in gepflanzten Jungbaumbeständen bzw. in durch natürliche Verjüngung entstandenen Beständen stellenweise enorme Ausfälle (Link, 2000; pers. Mitteilung). Das Massenvorkommen konzentriert sich derzeit auf das südliche Hessen und das nördliche Baden-Württemberg. Der Feldmaikäfer verursacht hauptsächlich in Obstplantagen und Weinbergen sowie stellenweise in Baumschulen, bei Kartoffeln, Erdbeeren, Zuckerrüben, Tabak und Hopfen wirtschaftliche Schäden. Das Vorkommen des Feldmaikäfers ist nicht flächendeckend; Probleme treten daher meist in einzelnen Spezialbetrieben auf, die verstreut im gesamten Bundesgebiet und in benachbarten Ländern liegen. Obst- und Weinbauern richten zum Teil ihre Neupflanzungen nach den Flugjahren des Maikäfers, um Ausfälle zu vermeiden (Epp und Buchmüller, 2001; pers. Mitteilungen). Der Junikäfer kommt nach eigenen Beobachtungen häufig als „Begleiter“ des Feldmaikäfers im gleichen Habitat und darüber hinaus in Kleingärten und auf Golfplätzen vor.

1.3.2 Bekämpfung des Maikäfers

Die bisherigen Bekämpfungsstrategien umfassen vor allem „Objektschutzmaßnahmen“, die einzelne gefährdete Kulturen schützen. Unter diese Maßnahmen fallen z.B. pflanzenbauliche Maßnahmen wie das Offenhalten des Bodens und das Auslegen von Maikäfernetzen in Obst- und Rebanlagen, welche die Maikäfer am Verlassen des Bodens für den Reifungsfraß bzw. am Eindringen der Weibchen zwecks Eiablage hindern, sowie die Ausbringung des spezifischen entomopathogenen Pilzes *Beauveria brongniartii*. Gegen die Käfer wurden Waldrandbehandlungen mit dem Insektizid Rubitox[®] (Wirkstoff: Phosalon) und Extrakten des indischen Neembaumes (NeemAzal-T/S[®], Wirkstoff: Azadirachtin) vom Hubschrauber aus durchgeführt (Meinert *et al.*, 2001). Berner & Schnetter (2002a; siehe Anhang) testeten erstmals den entomopathogenen Nematoden *H. bacteriophora* (nema-green[®], E-Nema) in Freilandapplikationen gegen Larven des Feldmaikäfers in Obstplantagen und Weinbergen.

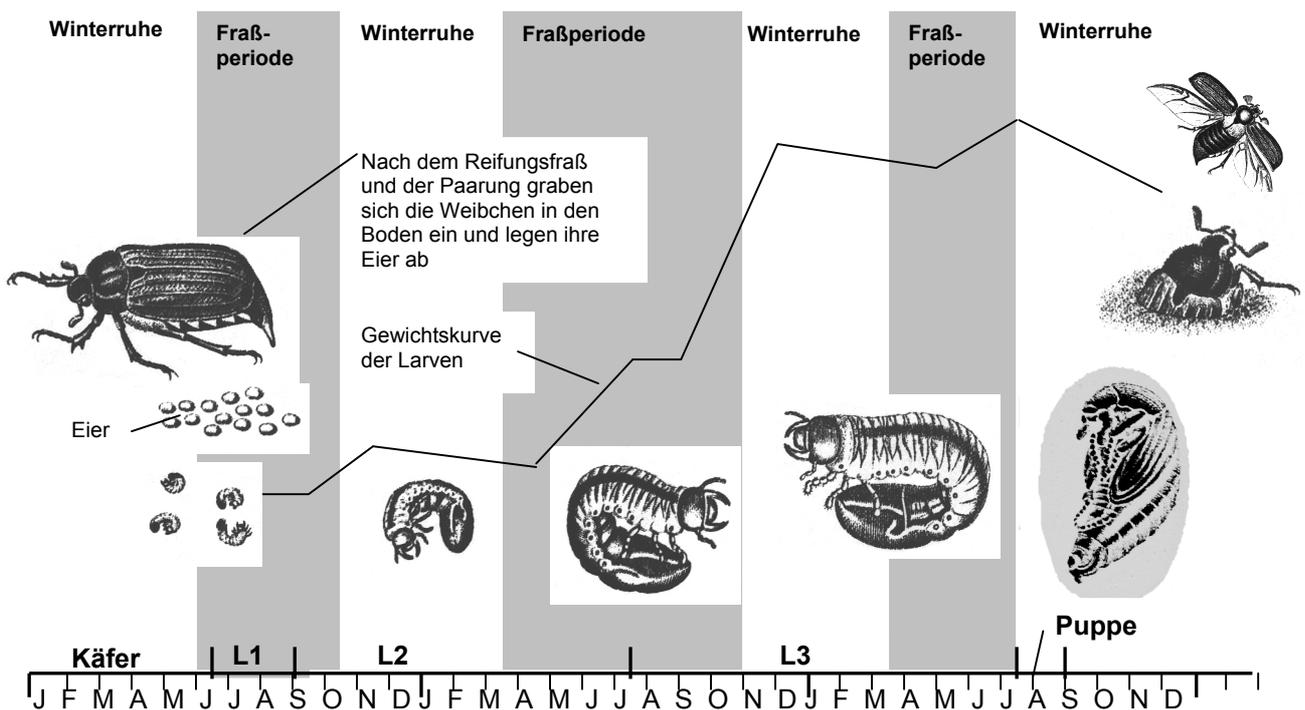


Abb. 1.3. Schematischer Lebenszyklus des Maikäfers bei 3-jähriger Generationsdauer. Die Käfer überwintern nach der Verpuppung in ihrer Puppenwiege und fliegen im nächsten Jahr. Die Hauptschäden werden durch Wurzelfraß der L3-Larven hervorgerufen. L1-3 = Larvenstadien. Die Skala für die Gewichtskurve reicht von etwa 0,1 g (L1) bis 2,2 g (L3). (verändert nach „Der Feldmaikäfer und seine Engerlinge“, Merkblatt des Pflanzenschutzdienstes Baden-Württemberg, Bearbeiter: M. Fröschle, Landesanstalt für Pflanzenschutz, Stuttgart, 1998)

2. Material und Methoden

2.1 Herkunft und Haltung der Insekten

2.1.1 Larven des Maikäfers und verwandter Käferarten

Die Larven des Maikäfers und verwandter Käferarten wurden durch Grabungen im Freiland gesammelt. Damit ständig genügend Tiermaterial zur Verfügung stand, wurde während einer Saison (April bis Oktober) mehrfach gesammelt. Aufgrund des mehrjährigen Lebenszyklus des Maikäfers konnten im selben Jahr an einem bestimmten Standort hauptsächlich das jeweils vorherrschende Larvenstadium gesammelt werden. Die Standorte und das zur Verfügung stehende Larvenstadium wechselten daher in jedem Sammeljahr. Neben den eigenhändig gesammelten Tieren, wurden auch zugesandte Tiere, die im Rahmen kooperierender Projekte gesammelt wurden, in den Versuchen eingesetzt (Tab. 2.1).

Tab. 2.1. Herkunft, Habitat, Bodentyp sowie Stadium (LS) der in dieser Arbeit verwendeten Larven des Feld- und Waldmaikäfers, des Junikäfers und des Japankäfers. He = Hessen, BW = Baden-Württemberg.

Art	Herkunft	Habitat (Bodenart)	LS
Feldmaikäfer (<i>Melolontha melolontha</i>)	Nieder-Beerbach (bei Darmstadt, He) ¹	Obstplantage (Lehm)	L3
	Dielheim-Horrenberg (bei Wiesloch, BW) ²	Obstplantage (Lehm)	L3
	Obergrombach (bei Bruchsal, BW) ³	Weinberge/Wiesen (Lehm)	L2, L3
	Amoltern, Bischoffingen u.a. (am Kaiserstuhl, BW) ⁴	Weinberge (Lehm)	L2, L3
	Mecklenburg-Vorpommern ⁵	Obstplantage	L3
Waldmaikäfer (<i>Melolontha hippocastani</i>)	St. Leon Roth (Wiesloch, BW) ⁶	Wald (schluffiger Sand)	L2, L3
	Lorsch (He) ⁷	Wald (schluffiger Sand)	L2, L3
Junikäfer (<i>Amphimallon solstitialis</i>)	Brühl (Schwetzingen, BW) ⁸	Wiese (schluffiger Sand)	L3
	Wiesloch (BW) ⁹	Golfplatz (Lehm)	L3
Japankäfer (<i>Popillia japonica</i>)	Azoren ¹⁰		L3

¹ Willi G. Muth, Obsthof Breitenloh, 64367 Mühlthal 3

² M. Epp, Hohberghof, Am Hohberg 2, 69234 Horrenberg

³ Gemeinde Obergrombach, Robert-Stolz-Str. 11, 76646 Obergrombach

⁴ Friederike Maass, Regierungspräsidium Freiburg, Bertoldstr. 43, 79098 Freiburg

⁵ Frau Rehm, Landespflanzenenschutzamt MV, Außenstelle Schwerin, Wickendorfer Str. 4, 19055 Schwerin

⁶ W. Link, Staatl. Forstrevier Untere Lußhardt, Sebastian Lorenz 2, 68789 St. Leon Rot

⁷ Hessische Landesanstalt für Forsteinrichtung, Waldforschung u. Waldökologie, 34346 Hann. Münden

⁸ Dr. A. Askani, Gemeinde Brühl, Hauptstr. 1, 68782 Brühl

⁹ Golf- u. Landclub Wiesloch, Hohenhardter Hof, 69169 Wiesloch 4

¹⁰ Dr. D. Lopez, Universität der Azoren, Terceira, Azoren

Haltung der Engerlinge

Die Engerlinge wurden im Dunkeln einzeln in Zuchtbehältern (Fa Greiner, Ø 36 mm, Höhe 83 mm) in der jeweiligen Herkunftserde gehalten. Von April bis Oktober erfolgte die Haltung im Klimaraum bei 15°C, gefüttert wurde alle 8-14 Tage mit einer Karottenscheibe. Von November bis März wurden die Engerlinge bei 4-6°C in einem Kühlraum gehalten, eine Fütterung war nicht notwendig. Bei den regelmäßigen Fütterungen und Kontrollen wurde die Feuchtigkeit der Erde überprüft und diese gegebenenfalls befeuchtet. Zur kurzfristigen Lagerung wurden Engerlinge zum Teil zu mehreren (30-40 Stück) in flachen Plastikwannen (50 x 80 x 20 cm) mit etwa 10 cm Erdfüllung und einer oben aufgelegten, ausgestochenen Grasnarbe gehalten. Die Engerlinge wurden nach dem Sammeln sobald als möglich für Versuche verwendet.

Tab. 2.2. Die einzelnen Larvenstadien (LS) des am häufigsten in Versuchen eingesetzten Feldmaikäfers (*M. melolontha*) konnten über deren Gewicht charakterisiert werden. Es bedeuten: f, m, s = frühes, mittleres und spätes (kurz vor der Häutung zum nächsten Larvenstadium) Stadium (vgl. Abb. 1.3).

LS →	L1	L2		L3			Puppe
Stadium	m	f	s	f	m	s	m
Gewicht [g]	< 0,3	0,3-0,6	0,6-0,8	0,8-1,4	1,4-1,8	1,8-2,2	1,8-2,2

2.1.2 Große Wachsmotte (*Galleria mellonella*)

Die in der Arbeit verwendeten Larven der Großen Wachsmotte (0,3-0,4 g) stammten aus eigener Zucht. Die Motten wurden in mit Fliegengaze überspannten 1 l Einmachgläsern bei 28-30°C im Dunkeln in einem Brutschrank gehalten. Über der Gaze wurde ein Papierfilter oder ein Papierhandtuch gespannt. Die Imagines legen ihre Eier bevorzugt durch die Gaze auf das Papierfilter. Die Eier wurden regelmäßig in neue Gläser mit frischem Futter überführt. Bei Überschuss konnten die Eier auch für einige Tage bei 6°C zwischengelagert werden. Die Rezeptur für das verwendete Futter findet sich in Wyniger (1974).

2.1.3 Mehlkäfer (*Tenebrio molitor*)

Die Larven des Mehlkäfers („Mehlwürmer“; 0,08-0,12 g) wurden regelmäßig in einer Zoohandlung bezogen und bis zum Gebrauch bei 4-6°C aufbewahrt. Den Tieren wurde trockenes Brot oder Haferflocken als Nahrung angeboten. Die Tiere wurden sobald als möglich nach Bezug in Versuchen eingesetzt.

2.2 Herkunft und Haltung der Nematoden

Die verwendeten Nematodenarten und -stämme stammten zum größten Teil aus der Stammhaltung des Instituts für Phytopathologie der Universität Kiel (Tab. 2.3). Als Stamm werden in dieser Arbeit Isolate derselben Art aus unterschiedlichen geografischen Regionen bezeichnet, während eine Linie die Zuchtfolge innerhalb desselben Stammes kennzeichnet. Re-Isolate sind in Feldapplikationen ausgebrachte und nach einiger Zeit wieder isolierte Stämme.

2.2.1 Vermehrung der Nematoden

Die Nematoden wurden vor jedem Versuch frisch vermehrt und nach dem Abernten innerhalb von zwei Wochen in den jeweiligen Versuchen eingesetzt. Die Vermehrung erfolgte *in vivo* in Larven der Großen Wachsmotte. Hierzu wurde eine Petrischale randvoll mit feuchtem Sand (10% w/w) gefüllt. In den Sand wurden etwa 4 mm breite Löcher gestanzt, in die jeweils eine *Galleria*-Larve mit dem Kopf nach unten gesteckt wurde. Auf jede *Galleria*-Larve bzw. den umgebenden Sand wurden etwa 100 Nematoden-Dauerlarven in wässriger Suspension pipettiert. Die infizierten Larven (erkennbar an der typischen Verfärbung) wurden nach einigen Tagen in White-Fallen (Woodring & Kaya, 1988) gelegt. Als Auffangschale diente eine normale Petrischale (Ø 94 mm), in die als Podest der Deckel einer kleinen Petrischale (Ø 35 mm) gelegt wurde. Auf dieses Podest wurde ein 40 mm Papierrundfilter (Schleicher & Schuell) gelegt, auf dem das (die) infizierte(n) Insektlarve(en) gelegt wurde(n). Die Auffangschale wurde bis zur Höhe des Podests mit destilliertem Wasser gefüllt (das Rundfilter muss feucht sein), danach wurde der Deckel der großen Petrischale wieder aufgesetzt. Die Vermehrung erfolgte bei Raumtemperatur (18-24°C). Bei der Gattung *Heterorhabditis* beginnen die Dauerlarven nach 12-14, bei *Steinernema* nach 7-10 Tagen aus dem Kadaver zu wandern. Die Nematoden wurden 3-8 Tage nach Beginn des Auswanderns abgeerntet und aufbereitet.

2.2.2 Aufbereitung der Nematoden-Suspension

Die Nematoden wurden vor dem Einsatz im Biotest und vor der Lagerung vorsichtig über ein 15 µm-Sieb unter fließendem Wasser gereinigt. Das Sieb wurde dann in eine mit etwas destilliertem Wasser/Insekten-Ringerlösung gefüllte Glasschale gestellt. Zur Abtrennung von toten Nematoden wurde die Suspension in ein 30 µm-Sieb für *Heterorhabditis* und ein 48

µm-Sieb für *Steinernema* gegeben (Gaze von Hydro-Bios, Kiel). Das flache Sieb wurde so über eine mit destilliertem Wasser/Insekten-Ringerlösung gefüllte Glasschale angeordnet, dass die Unterseite leicht in die Flüssigkeit eintauchte. Die lebenden und aktiven Dauerlarven passierten das Sieb innerhalb weniger Minuten. Aufgrund von Qualitätsunterschieden einzelner Chargen wurden viele Versuche mit verschiedenen Chargen des gleichen Nematoden-Stammes wiederholt oder mehrere Chargen vereint. Enthielt eine Nematoden-Suspension relativ viele (> 5-10%) tote Dauerlarven (erkenntlich am gestreckten, unbewegten Körper), so war diese Charge erfahrungsgemäß nur bedingt für Versuche zu gebrauchen. Eine gestörte Vermehrung der Nematoden war mit etwas Erfahrung oft schon vor dem Auswandern der Dauerlarven erkenntlich (untypische/uneinheitliche Verfärbung der infizierten Larven, Erscheinen von adulten Nematoden in der Auffangschale). Entsprechende Chargen wurden verworfen.

2.2.3 Zählen der Nematoden und Einstellung der Suspension

Die Verteilung der Nematoden in einer aufgeschüttelten Suspension entspricht einer Poisson-Verteilung (Kramer, 2000). Die Zahl der Nematoden in einer Suspension wurde daher anhand von mind. fünf Stichproben-Zählungen mit je nach Nematoden-Dichte 10, 20, 50 oder 100 µl Volumen ermittelt. Vom Durchschnitt dieser Auszählungen wurde die Gesamtzahl der Nematoden durch Hochrechnen auf das Gesamtvolumen der Suspension berechnet. Zur Einstellung einer definierten Konzentration, wurde das Volumen mit der gewünschten Anzahl Nematoden in einen Messzylinder überführt und durch Auffüllen bzw. Einengen (nach dem Absetzen der Nematoden) bis zum gewünschten Volumen eingestellt. Die Konzentration der Suspension wurde dann durch erneute Stichproben-Zählungen überprüft.

Bei der Auswertung von Versuchen (z.B. bei der Ermittlung der Zahl penetrierter Nematoden) wurden die Suspensionen stets vollständig ausgezählt. Als Zählkammern dienten mittlere Petrischalen (Ø 60 mm), auf deren Unterseite die vier Quadranten der Platte gezeichnet waren. Die Zählungen erfolgten im Durchlicht bei 10-20facher Vergrößerung.

2.2.4 Lagerung der Nematoden

Die längerfristige Lagerung der Nematoden erfolgte bei 4-6°C in Insekten-Ringerlösung in horizontal gelegten 50 ml Zellkulturflaschen (Greiner, Fläche 25 cm², Füllhöhe 3-4 mm). Die Deckel wurden nicht ganz zuge dreht (oder es kamen luftdurchlässige Deckel zum Einsatz), damit ein Luftaustausch gewährleistet war. Die Arten/Stämme der Gattung *Heterorhabditis*

wurden 2-3 mal, die der Gattung *Steinernema* einmal jährlich vermehrt. Einige der Selektionslinien wurden im Institut für Phytopathologie der Universität Kiel auch in flüssigem Stickstoff (-80°C) dauerhaft konserviert.

Tab. 2.3. Die verwendeten Nematodenarten und -stämme sowie deren Bezeichnung, Herkunft und Quelle.

Art	Stammbez.	Herkunft	Bemerkung	Quelle
<i>Steinernema glaseri</i> Steiner, 1929	NC	North Carolina, USA		A. Koppenhöfer ¹
	RS92	USA		R.-U. Ehlers ²
	NJH	New Jersey, USA		R.-U. Ehlers
<i>S. arenaria</i> Kozodoi, 1984		Russland	alter Name: <i>S. anomali</i>	R.-U. Ehlers
<i>S. spec.</i>	E		E steht für Ehlers	R.-U. Ehlers
<i>S. spec.</i>	Devil	Marokko		R.-U. Ehlers
<i>S. feltiae</i> Filipjev, 1934	E-Nema	Deutschland	kommerzieller Stamm	A. Peters ³
	Neudorff	Deutschland	kommerzieller Stamm	W. Neudorff ⁴
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> Poinar, 1976	HK3	Darmstadt, Deutschland	isol. a. Larve d. Junikäfers	H. Bathon ⁵ /Ehlers
	HD01	Darmstadt, Deutschland		H. Bathon/Ehlers
	IH127	Italien		K.V. Deseö/Ehlers
	H06	China		R.C. Han ²
	T	Türkei		A. Susurluk ²
	MOL	Moldavien		P. Smits ⁶ /Ehlers
	BRE	Brecon, Australien		R. Akhurst ⁷ /Ehlers
	HP88	Logon, Utah, USA		I. Glazer ⁸ /Ehlers
	BAY	USA		H.K. Kaya ⁹ /Ehlers
	NCI	USA		A. Koppenhöfer
	U	USA		A. Koppenhöfer
	W	USA		A. Koppenhöfer
	HYB	New Jersey, USA	kommerzieller Hybrid	R. Gaugler ¹⁰ /Ehlers
	RW	Rhein Wied, Deutschland	Re-Isolation von HYB	R.-U. Ehlers
	Re02	Deutschland	Re-Isolation von HYB	R.-U. Ehlers
	Re08	Deutschland	Re-Isolation von HYB	R.-U. Ehlers
	PS7		Hybrid aus 7 Stämmen	R.-U. Ehlers
	MB1	Kaiserstuhl, Deutschland	isoliert aus Larven des Feldmaikäfers	M. Berner
	MB2	Kaiserstuhl, Deutschland		M. Berner
	<i>H. megidis</i> Poinar, Jackson & Klein, 1987	HN1	Deutschland	
HSH2		Deutschland		R.-U. Ehlers
HSH3		Deutschland		R.-U. Ehlers
NLH		Niederlande	isol. a. Larve d. Junikäfers	P. Smits/Ehlers
HW79		Schweiz	kommerzieller Stamm	M. Andermatt ¹¹
<i>H. marelatus</i> Liu & Berry, 1996b	-	USA		A. Koppenhöfer
<i>Caenorhabditis elegans</i> Maupas, 1899	Wildtyp		Laborstamm	F. Möhrle ¹²

¹ Albrecht Koppenhöfer, Rutgers University, Dept. of Entomology, New Brunswick, NJ 08901, USA

² Ralf-Udo Ehlers, R.C. Han, A. Susurluk, Inst. f. Phytopathologie, Abt. f. Biotechnologie, Univ. Kiel, Klausdorfer Str. 28-36, 24223 Raisdorf, Deutschland

³ Arne Peters, E-Nema, Klausdorfer Str. 28-36, 24223 Raisdorf, Deutschland

⁴ W. Neudorff, PF 1209, 31857 Emmerthal, Deutschland

⁵ Horst Bathon, Inst. f. biologischen Pflanzenschutz, Biologische Bundesanstalt, 64287 Darmstadt, Deutschland

⁶ Peter Smits, Plant Research Int., Postbus 16, Binnenhaven 5, 6700 PD Wageningen, The Netherlands

⁷ Ray Akhurst, CSIRO, Division of Entomology, GPO Box 1700, 2601 Canberra, ACT, Australien

⁸ Itamar Glazer, Volcani Center, P.O. Box 6, Bet-Dagan, 50250 Israel

⁹ Harry K. Kaya, Univ. of California, Dept. of Nematology, Davis, CA 95616, USA

¹⁰ Randy Gaugler, Rutgers Univ., Dept. of Entomology, PO Box 231, NJ 08903/0231 New Brunswick, USA

¹¹ Martin Andermatt, Andermatt Biocontrol AG, Stahlermatten 6, 6146 Grossdietwil, Schweiz

¹² Frank Möhrle, Zoologisches Inst., Univ. Heidelberg, INF 230, 69120 Heidelberg, Deutschland

2.2.5 Oberflächensterilisation von Nematoden

Um die Außenseite (Oberfläche) der Dauerlarven möglichst keimfrei zu bekommen, erfolgte eine Oberflächensterilisation nach Lunau *et al.* (1993). Dabei wurde wie folgt vorgegangen (in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen):

- Zentrifugieren der Nematoden-Suspension (3 min, 1000 rpm), Überstand verwerfen
- Zugabe einer 0,5%igen NaOCl-Lösung, 20 min Inkubation
- 3 x Waschen mit steriler Insekten-Ringerlösung

2.2.6 Erzeugung von Inzuchtlinien

Für Selektionsexperimente und die Abschätzung der Heritabilität verschiedener Eigenschaften von *H. bacteriophora* wurde am Institut für Phytopathologie in Kiel ein Hybrid-Stamm erzeugt (Tab. 2.4). Aus dem Hybrid-Stamm wurden durch Selbstbefruchtung über sieben Generationen 30 Inzuchtlinien etabliert (Johnigk *et al.*, 2002). Von diesen 30 Linien wurden 20 in vorliegender Arbeit für verschiedene Untersuchungen verwendet.

Zum besseren Verständnis sei das Vorgehen bei der Erzeugung der Inzuchtlinien im Folgenden erklärt. Zunächst wird ein Nähragar (Wouts-Agar) mit den symbiotischen Bakterien des Hybrid-Stammes (*P. luminescens*) beimpft. Nach 24 Stunden bei 25°C werden sterile Dauerlarven zugegeben, die sich nach drei Tagen zu reifen Hermaphroditen entwickelt haben. Zu diesem Zeitpunkt haben sich noch keine adulten Geschlechtsstiere der Folgegeneration entwickelt, eine Fremdbefruchtung ist somit ausgeschlossen. Die Hermaphroditen werden einzeln in mit Ringerlösung gefüllte 24-Loch Platten gesetzt. Jedes Individuum ist Ausgangspunkt für eine Inzuchtlinie. Da in den 24-Loch Platten kein Nährsubstrat vorhanden ist, legen die Hermaphroditen keine Eier nach außen ab. Nach der Selbstbefruchtung entwickeln sich die Larven daher im Leib der Muttertiere (= *Endotokia matricida*; Johnigk & Ehlers, 1999a,b). Nach 3-4 Tagen haben sich Dauerlarven entwickelt, die erneut in eine mit den symbiotischen Bakterien vorkultivierte Nähragar-Platte gegeben werden. Der Zyklus beginnt nun von vorne. Für jede Linie werden zur Sicherheit drei Hermaphroditen vereinzelt. Alle Inzuchtlinien wurden mit dem gleichen Bakterienklon kultiviert, um den Anteil der genetischen Varianz der Bakterien an der phänotypischen Varianz der Inzuchtlinien zu minimieren.

Der Inzuchtkoeffizient F_t nach der t -ten Generation Selbstbefruchtung berechnet sich nach der Rekursionsformel $F_t = 1/2(1 + F_{t-1})$ (Schüler *et al.*, 2001). Nach einer Generation ist $F_1 = 0,5$,

nach sieben Generationen gilt $F_7 = 0,992$. Der Wert des Inzuchtkoeffizient entspricht dem Anteil homozygoter Individuen innerhalb der Linie.

Tab. 2.4. Die Ausgangsstämme von *H. bacteriophora*, die zur Erzeugung des Hybrid-Stammes (durch paarweise Kreuzungen) verwendet wurden und die aus dem Hybrid-Stamm abgeleiteten Inzuchtlinien sowie deren jeweilige Bezeichnungen. Der Hybrid-Stamm wird in dieser Arbeit mit „PS7“ bezeichnet, abgeleitet vom englischen „*Parent Strains 7*“ (Johnigk, 2000; pers. Mitteilung). Der Buchstabe bei der Bezeichnung einer Inzuchtlinie steht für die Charge aus der die Hermaphroditen vereinzelt wurden. Der Stamm „BG“ wurde in Bergisch Gladbach, Deutschland, isoliert (Quelle: R.-U. Ehlers), die Herkunft der übrigen Stämme ist in Tab. 2.3 aufgeführt.

Ausgangs-stämme	Hybrid-Stamm	Inzuchtlinien
HD01	PS7	A1, A4
HK3		B2, B3, B4, B7, B10
BG		C2, C4, C5, C7
BRE		D1, D4, D7, D11
HP88		E6, E7
MOL		F3
HYB		G5
		H6

2.2.7 Kreuzung von *Steinernema*-Stämmen

Die Kreuzung der *S. glaseri*-Stämme und –Linien wurde in Anlehnung an Akhurst & Bedding (1978) durchgeführt. Die Nematoden wurden zunächst oberflächensterilisiert. Von den zu kreuzenden Nematoden-Stämmen wurde ein Teil der Suspension unter sterilen Bedingungen auf eine Petrischale pipettiert. Von jedem Stamm wurde eine Dauerlarve mit möglichst wenig Volumen in die Kanüle (Fa Dispomed Witt, Neobject, Ø 0,4 mm) einer 1 ml Spritze (Primo Micro Syringe) gesogen. Die beiden Dauerlarven wurden dann in eine *Galleria*-Larve injiziert. Da sich *S. glaseri* ausschließlich sexuell vermehrt, kann es nur zu einer Vermehrung kommen, wenn von einem Stamm ein Weibchen und vom anderen ein Männchen (oder umgekehrt) injiziert wurde. Dies ist unter der Annahme eines Geschlechterverhältnisses von 1:1 in 25% der injizierten *Galleria*-Larven zu erwarten. Für jede Kreuzung wurden mind. 20 Larven injiziert.

2.2.8 Messung des Lipidgehalts der Nematoden

Die Messung des Lipidgehalts der Nematoden erfolgte in Anlehnung an Jung (1999) über eine enzymatische Bestimmung mit einem Triglycerid-Reagenz (GPO-Trinder, Sigma). Für jede Nematoden-Charge wurden 3 Proben mit jeweils 3000 Nematoden 3 x in sterilem, destilliertem Wasser gewaschen und in Mikrohomogenisatoren aus Glas 5 min lang homogenisiert (20-50 µl Volumen). Das Homogenat wurde durch Ausspülen mit 500 µl Methanol in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dann folgten:

- Zugabe von 2 x 250 µl Chloroform, dazwischen gründlich vortexen

- Zugabe von 250 µl destilliertem Wasser, leichtes Vortexen (Suspension wird weiß)
- Zentrifugation (5 min, 8000 rpm), untere Chloroform-Phase enthält Triglyceride
- Mit einer dünnen Pipettenspitze die untere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführen, Chloroform über Nacht unter dem Abzug verdunsten lassen
- Resuspension des Fetts in 10 µl Chloroform, Zugabe von 1 ml Testreagenz

Bei jeder Messung wurden je drei Nullkontrollen (10 µl Wasser + 1 ml Testreagenz) und Standards (10 µl Glycerol-Standardlösung von Sigma + 1 ml Testreagenz) angesetzt. Die Proben wurden 15 min bei 25°C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Die Extinktion wurde bei 540 nm in einem Spektrophotometer (Novaspec II, Pharmacia Biotech) gemessen, die Referenzmessung erfolgte mit destilliertem Wasser. Der durchschnittliche Lipidgehalt eines einzelnen Nematoden berechnet sich wie folgt:

$$\text{Lipidgehalt/Nematode } [\mu\text{g}] = \frac{E_{\text{Probe}}}{E_{\text{Standard}}} \frac{E_{\text{Nullkontrolle}}}{E_{\text{Nullkontrolle}}} \times \frac{25}{3000}$$

2.3 Biotests

Für die Biotests wurden die Engerlinge einzeln in die entsprechenden Behältnisse gesetzt, während die Mehlwürmer auch zu mehreren eingesetzt wurden. Wenn nicht anders erwähnt, wurde als Standard-Substrat eine lockere, sandige Erde aus dem Wald bei St. Leon Rot verwendet (Tab. 2.5). Die Substrate wurden autoklaviert und vollständig getrocknet (mind. 4 h bei 80°C). Die Feuchtigkeit wurde vor dem Befüllen der Gefäße mit destilliertem Wasser auf 10% (w/w) eingestellt. Das Volumen der Nematoden-Suspension mit der gewünschten Zahl an Nematoden wurde so bemessen, dass sich eine Endfeuchtigkeit von etwa 14% (w/w) ergab. Die Zugabe der Nematoden erfolgte stets vor Zugabe der Insektenlarven. Vor Beginn des Biotests wurde ein Teil der Larven (mind. 10 Stück) gewogen. Alle Biotests wurden im Dunkeln bei 20-23°C und 80-90% relativer Luftfeuchtigkeit durchgeführt.

2.3.1 Charakterisierung der verwendeten Bodensubstrate

Zur Charakterisierung der Bodensubstrate (Tab. 2.5) wurde neben dem Trockengewicht (= Lagerungsdichte ρ_a) der pH-Wert einer Aufschlämmung von 1 Teil Boden in 2,5 Teilen 0,01molarer CaCl_2 -Lösung ermittelt. Die pH-Messungen in CaCl_2 -Lösung sind etwa 0,6 Einheiten tiefer als in reinem Wasser und besser reproduzierbar (Gisi *et al.*, 1997).

Die Bestimmung des Anteils der Kornfraktionen erfolgte durch Aufschlemmung und Sieben (vgl. Müller, 1964). Die Zuordnung der Substrate zu einer Bodenart erfolgte nach Gisi *et al.* (1997) und Müller (2002; pers. Mitteilung; vgl. Müller, 1964).

Tab. 2.5. Die in den Biotests verwendeten Bodensubstrate und deren Charakterisierung.

Substrat-Bezeichnung →	Standard	Sand	Lehm
Herkunft	Wald, St. Leon Rot	käuflicher Quarzsand	Wiese, Bruchsal
Bodenart	schluffiger Sand	Sand	sandiger Schluff
Kornfraktionen der Feinerde (%):		(Korngröße 100-400 µm)	
> 63 µm	87,7	> 99	16,6
20-63 µm	3,6		47,6
< 20 µm	8,6		35,9
Trockengewicht [g/cm ³]	1,16	1,40	1,03
pH-Wert	3,60	6,20	7,42
Gewicht von 25 cm ³ bei 10% Feuchtigkeit [g]	22	25	24

2.3.2 Testsystem I

Die Biotests im Testsystem I wurden in Zuchtbehältern (Greiner, Ø 41 mm, Höhe 57 mm) durchgeführt. Die gewünschte Zahl Nematoden wurde jeweils in 1 ml destilliertem Wasser zugegeben. In diesem Testsystem wurden L2- und L3-Larven bzw. das Puppen-Stadium von *M. melolontha*, *M. hippocastani* und *A. solstitialis* eingesetzt. Die Engerlinge wurden alle 2-3 Tage kontrolliert und 1-2 x pro Woche mit einer Karotten-Scheibe gefüttert.

Die Mehlwürmer wurden zu acht in die vorbereiteten Zuchtbehälter gesetzt. Das Verhältnis der eingesetzten Tiere zum Substratvolumen ist den Empfehlungen der Firma E-Nema (Raisdorf; www.e-nema.de) angelehnt und entspricht dem Testsystem für die Engerlinge; eine direkte Vergleichbarkeit ist dadurch gegeben. Testsysteme mit mehreren *Tenebrio*-Larven in einem Gefäß haben sich bewährt (Peters, 2000b; Peters, 2001; pers. Mitteilung).

2.3.3 Testsystem II

Die Biotests im Testsystem II wurden mit 24-Loch Platten für Gewebekulturen (Greiner und Falcon) durchgeführt. Jedes Loch (Ø 16 mm, Volumen 2,9 ml) diente dabei als Behältnis für eine Insektenlarve. Vorteil dieses Testsystems ist die platz-, material- und zeitsparende Durchführbarkeit, vor allem bei umfangreicheren Versuchen. Dieses System wurde für L2-Engerlinge (Bodensubstrat: 2 g feuchtes Standard-Substrat pro Loch) und für Mehlwürmer (Bodensubstrat: Sand) angewandt. Die Nematoden wurden in je 100 µl Suspension zugegeben.

Zur schnellen und gleichmäßigen Füllung der Löcher mit dem Sand wurde der Deckel der 24-Loch-Platte randvoll, aber locker mit 10% feuchtem Sand gefüllt (entspricht ≈ 65 g). Danach wurde die 24-Loch-Platte mit den Öffnungen nach unten in den Sand gedrückt. Nach dem Umdrehen und Abklopfen des Sandes am Deckel sind in jeder Öffnung etwa 2 g feuchter Sand.

2.3.4 Orale Injektion der Nematoden

Bei der oralen Injektion wurden Nematoden über die Mundöffnung von *M. melolontha*-Larven (L3) in das Darmlumen injiziert. Die Nematoden wurden zuvor oberflächensterilisiert (siehe 2.2.5). Die Nematoden-Suspension wurde dann auf eine Petrischale pipettiert. Mit einer 1 ml Spritze (Primo Micro Syringe), die mit Insekten-Ringerlösung gefüllt war, wurde die gewünschte Anzahl Dauerlarven mit der Kanüle (B. Braun, Sterican, \varnothing 0,7 mm) mit möglichst wenig Ringerlösung aufgesogen. Zur Vermeidung von Verletzungen des Engerlings, wurde die Spitze der Kanüle mit einer Feile abgestumpft. Die Kanüle wurde nach Überwindung der basalen, harten Partien der Mandibeln etwa 4-5 mm tief in paralleler Verlängerung zum Darmkanal eingeführt. Das Injektionsvolumen betrug in Abhängigkeit von der Dosis 10-30 μ l.

Bei der Injektion von Dauerlarven war besondere Sorgfalt darauf zu legen, dass die Kanüle nicht verstopfte (vor allem bei den höheren Dosierungen und den größeren Dauerlarven von *S. glaseri*). Die Kanüle wurde daher zwischen zwei Injektionen stets durchgespült.

2.3.5 Hämocoelale Injektion der Nematoden

Bei der hämocoelalen Injektion wurden Nematoden durch die Epidermis von *M. melolontha*-Larven (L3) in das Hämocoel injiziert. Die Nematoden wurden zuvor oberflächensterilisiert (siehe 2.2.5). Die Nematoden-Suspension wurde unter sterilen Bedingungen auf eine Petrischale gegeben. Die gewünschte Anzahl Dauerlarven wurde mit einer Kanüle (Fa Dispomed Witt, Neoject, \varnothing 0,4 mm) mit möglichst wenig Ringerlösung aufgesogen (vgl. 2.3.4) und zwischen dem 2. und 3. Stigma unterhalb der Seitenleiste in einer der Körperquerfalten injiziert (10-20 μ l). Die Kanüle wurde mit der Spitze zum Kopf orientiert und möglichst flach eingeführt. Vor der Behandlung wurden die Engerlinge mit Hilfe einer Siebvorrichtung unter fließendem Wasser gründlich gewaschen. Nach dem Abtrocknen mit einem Papierhandtuch wurden sie zur Ruhigstellung für mindestens 10 Minuten auf Eis gelegt. Direkt vor und nach der Injektion wurde die Injektionsstelle mit einem in 70%igem

Ethanol getränktes Küchentuch abgetupft. Nach Einführung der Kanüle und Injektion des jeweiligen Volumens wurde die Kanüle für 10-20 sek unbewegt belassen, während gleichzeitig der Körper des Engerlings durch leichten Druck um die Injektionsstelle etwas massiert wurde. Diese Prozedur sollte die Verteilung und das Eindringen der injizierten Dauerlarven in das Hämocoel fördern und verhindern, dass injizierte Dauerlarven durch den beim Herausziehen der Kanüle entstehenden Sog wieder mit herausbefördert werden. Die Kanüle wurde dann möglichst rasch herausgezogen. Nach der Injektion wurden die Engerlinge für mind. 10 min auf einer sauberen Fläche belassen. Während dieser Zeit erholten sich die Tiere und die Injektionswunde war durch einen deutlich sichtbaren Melaninpilz verschlossen. Danach wurden die Tiere wieder in ihr ursprüngliches Substrat gesetzt (Testsystem I).

Als Kontrolle wurden Engerlinge mit 10 µl einer sterilen Insekten-Ringerlösung injiziert.

2.3.6 Isolierung der symbiotischen Bakterien

Die symbiotischen Bakterien der Nematoden wurden aus frisch infizierten *Galleria*-Larven isoliert. Die *Galleria*-Larven wurden wie in 2.2.1 beschrieben mit dem jeweiligen Nematoden-Stamm infiziert. Nach 1-2 Tagen wurde eine frisch infizierte *Galleria*-Larve oberflächensterilisiert, indem sie für 10 min in 70%igen Ethanol gelegt wurde. Danach wurde die Larve unter sterilen Bedingungen angeschnitten, ihr mit der Impföse etwas Hämolymphe entnommen und diese auf eine NBTA-Platte (Akhurst, 1980) ausgestrichen. Die Platten wurden bei 25°C im Brutschrank inkubiert. Nach 2-3 Tagen wurde kontrolliert. Je nach Reinheit der Kultur wurden 1-2 Reinigungsausstriche angefertigt. Die Bakterien wurden anhand der Kolonieförmigkeit, -färbung und -konsistenz sowie der Zellmorphologie (Zeiss Inversionsmikroskop, Ölimmersion mit Phasenkontrast bei 1000facher Vergrößerung) identifiziert (Akhurst, 1980, 1983).

Medien für die Bakterien

- **NBTA (Nutrient BTB TTC Agarose)**

Standard I Nutrient Agar (Difco)	3,7% w/v	37 g
BTB ¹ (Sigma)	0,0025% w/v	25 mg
TTC ² (Merck)	0,004% w/v	40 mg
pH 8,5		
mit Wasser auffüllen		ad 1000 ml

¹ BTB = Bromthymolblau,

² TTC = Triphenyltetrazoliumchlorid

- **TSB (Tryptic soy broth)**

Trypton aus Casein (Serva)	1,7% w/v	17 g
Trypton aus Soja (Serva)	0,3% w/v	3 g
Glukose (Merck)	0,25% w/v	2,5 g
NaCl (Roth)	0,5% w/v	5 g
K ₂ HPO ₄ (Ferak)	0,25% w/v	2,5 g
pH 8,0		
mit Wasser auffüllen		ad 1000 ml

Die Medien wurden für 20 min bei 121°C autoklaviert. Das TTC wird nach dem Autoklavieren (Temperatur < 50°C) in sterilfiltrierter Lösung zugegeben (Sterilfilter: Membra Pure, Membrex 18 und 25, CA 0,2 µm).

2.3.7 Aufbereitung der Bakteriensuspension und Injektion

Die symbiotischen Bakterien wurden wie in 2.3.6 beschrieben isoliert und 2-3 Tage vor der Injektion auf eine frische NBTA-Platte ausgestrichen. Mit einer Impföse wurden Bakterien in steriler Insekten-Ringerlösung suspendiert und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Nach Einstellung der Konzentration wurden 10 µl der Suspension pro Engerling injiziert. Zur Kontrolle wurden Engerlinge mit 10 µl steriler Insekten-Ringerlösung und mit jeweils 10 µl einer Suspension mit 1000 Bakterien der Art *Micrococcus luteus* oder *Bacillus thuringiensis japonensis* (Stamm Buibui) injiziert. Diese Bakterien wurden über Nacht bei 28°C auf TSB-Platten kultiviert und analog zu den symbiotischen Bakterien suspendiert und ausgezählt.

2.4 Untersuchung des Infektionsverhaltens und der Penetrationsroute

2.4.1 Wanderaktivität auf Agarplatten

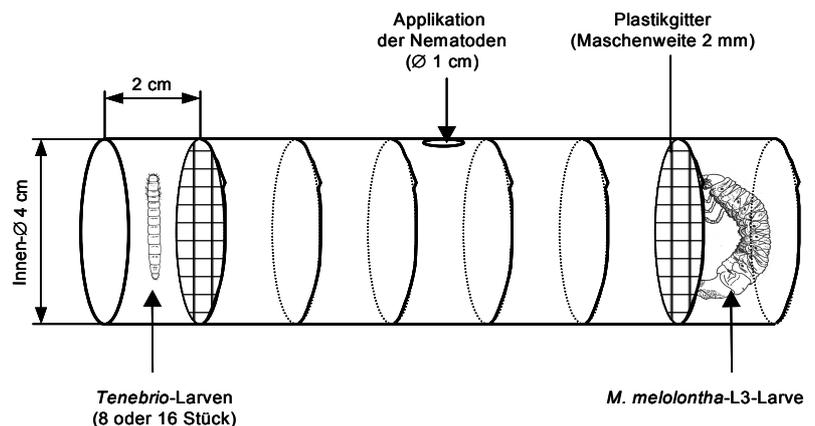
Die Untersuchung der Wanderaktivität auf Agaroseplatten erfolgte in Anlehnung an Grewal *et al.* (1993). Zunächst wurden Petrischalen (Ø 94 mm) mit einer aufgekochten 2%igen (w/w) Agaroselösung (in destilliertem Wasser) ausgegossen. Nach dem Abkühlen der Agarose auf Raumtemperatur wurden auf die Unterseite der Petrischalen ausgehend vom Mittelpunkt mit Hilfe einer Schablone jeweils drei Kreise gezeichnet ($r_1 = 10$ mm, $r_2 = 20$ mm, $r_3 = 30$ mm). Die eingestellte Nematoden-Suspension (50-100 Nematoden in 10-30 µl) wurde auf ein mit einem Locher ausgestanztes Filterpapierstückchen (Ø 5 mm) pipettiert. Überschüssige Lösung wurde von der Rückseite des Filterpapierstückchens mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt (wichtig, da sonst die Nematoden in der Flüssigkeit „schwimmen“). Das Filterpapierstückchen wurde dann mit der Vorderseite (auf der die Suspension pipettiert wurde) nach unten in das Zentrum der Agaroseplatte gelegt und gleichmäßig angedrückt. Die Verteilung der aus dem Filterpapier wandernden Nematoden auf der Agaroseplatte wurde durch Auszählen der Nematoden in den durch die drei Kreise abgegrenzten drei Ringzonen nach 1, 3, 6 und 12 min ermittelt. Die durchschnittliche von einem Nematoden zurückgelegte Strecke x wurde wie folgt berechnet: x [mm] = $(n_1(r_1+5) + n_2(r_2+5) + n_3(r_3+5)) \cdot N^{-1}$. Wobei n_i

die Zahl der Nematoden in der Ringzone i mit der mittleren Strecke r_{i+5} = Mitte zwischen r_i und r_{i+1} und N die Gesamtzahl Nematoden auf der Agaroseplatte ist.

2.4.2 Wanderaktivität, Wirtsfindung und -präferenz in Sandröhren

Die Versuche zur Wanderaktivität und Wirtsfindung der Nematoden in Sandröhren wurden in Anlehnung an Peters (1994) und Sulistyanto (1997) durchgeführt (Abb. 2.1). Als Substrat diente feuchter Quarzsand (10% w/w). Die Polypropylen-Röhren (Innen-Ø 4 cm, Wandstärke 4 mm) bestanden aus sieben 2 cm langen Abschnitten, die mit Klebeband fixiert wurden. Die Nematoden wurden in 1 ml Suspension in den mittleren Abschnitt pipettiert. Zur Untersuchung der Wirtsfindung wurden in einem der letzten Abschnitte eine *M. melolontha*-L3-Larve oder acht *Tenebrio*-Larven gesetzt, die andere Seite blieb unbesetzt. Die Larven wurden durch ein Plastikgitter (Maschenweite 2 mm) am Verlassen des Abschnitts gehindert. Zur Untersuchung der Wirtspräferenz wurde auf eine Seite eine *M. melolontha*-L3-Larve gesetzt, auf die andere kamen 8 oder 16 *Tenebrio*-Larven. Zum Vergleich wurde die Wanderaktivität der Nematoden ohne die Anwesenheit einer Insektenlarve untersucht. Die Auszählung der Nematoden in jedem der Abschnitte erfolgte nach 72 h. Der Sand eines Abschnitts wurde hierzu 2 x in 300-400 ml Wasser suspendiert und kräftig geschüttelt. Der Überstand wurde zum Abfangen der Nematoden über ein 15 µm-Sieb dekantiert. Die bereits in die Insektenlarve(n) penetrierten Nematoden wurden nach Sektion der Larven gezählt.

Abb. 2.1. Versuchsanordnung zur Untersuchung der Wanderaktivität, Wirtsfindung und -präferenz der Nematoden in sandgefüllten Röhren. Die einzelnen Abschnitte lassen sich trennen und wurden durch Klebeband fixiert.



2.4.3 Exposition des Mundes oder des Anus

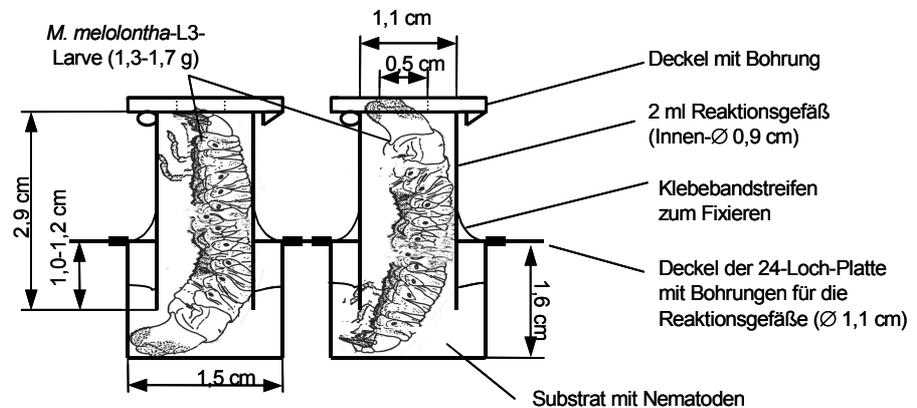
Um zu prüfen, ob die Nematoden über die Mundöffnung oder die Analöffnung effektiver in die Engerlinge eindringen und diese infizieren (töten) können, wurde eine spezielle Versuchskonstruktion entwickelt (modifiziert nach Forschler & Gardner, 1991; Abb. 2.2). Zur Fixierung des Engerlings diente ein 2,9 cm unter dem oberen Rand abgesägtes 2 ml

Eppendorf-Reaktionsgefäß. In den Deckel wurde zur besseren Luftzufuhr ein 5 mm breites Loch gebohrt. In den Deckel einer 24-Loch-Platte wurden jeweils zentriert über den Löchern 1,1 cm breite Bohrungen angefertigt. In die abgesägten Reaktionsgefäße wurde jeweils eine *M. melolontha*-Larve (mittleres L3-Stadium, vgl. Tab. 2.2) mit dem Kopf oder dem Hinterteil nach oben gesteckt, danach wurde der Deckel des Reaktionsgefäßes geschlossen. Das Reaktionsgefäß wurde nun etwa 1,0-1,2 cm tief durch eine der Deckelbohrungen gesteckt (Deckelseite nach oben) und durch 1-2 Klebebandstreifen zusätzlich am Deckel der 24-Loch-Platte fixiert.

Die Vertiefungen der 24-Loch-Platte wurden mit 1,4 g 7,5% (w/w) feuchtem Standard-Substrat gefüllt und mit 100 µl der Nematoden-Suspension beschickt.

Abb. 2.2.

Versuchsanordnung bei der Exposition des Mundes oder des Anus. Es sind zwei Vertiefungen der 24-Loch-Platte mit aufgesteckten 2 ml Reaktionsgefäßen mit je einem Engerling im Querschnitt dargestellt.



2.4.4 Gewinnung von Darmsaft und Hämolymphe aus Insektenlarven

Die Larven wurden unter fließendem Wasser gewaschen, mit Papierhandtüchern getrocknet und zur Ruhigstellung für mindestens 10 min auf Eis gelegt. Bei *M. melolontha*- und *Tenebrio*-Larven wurde die Hämolymphe gewonnen, indem ein Bein der Larve abgeschnitten und die austretende Hämolymphe direkt mit einer Pipette abgenommen und in einem eisgekühltem Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt wurde. *Galleria*-Larven, *Tenebrio*-Larven und *M. melolontha*-Puppen wurden zur Isolierung der Hämolymphe punktiert bzw. aufgeschnitten.

Zur Gewinnung von Darmsaft des Mitteldarms wurden *M. melolontha*-Larven direkt hinter der Kopfkapsel mit einer Schere dekapitiert. In der Regel tritt dann der geschlossene Mitteldarm hervor. Nach Entfernung restlicher Hämolymphe durch Abtupfen mit einem Küchentuch, wurde der Mitteldarm über einem Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgeschnitten und der austretende Darmsaft abgefangen. Zur Isolierung von Darmsaft aus dem Enddarm wurde der komplette (geschlossene) Enddarm herauspräpariert, abgetupft und über einem

Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgeschnitten. Die Hämolymphe als auch der Darmsaft wurden entweder sofort im Versuch eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

2.4.5 Bestimmung der Phenoloxidasen-Aktivität von Hämolymphe

Die Bestimmung der Phenoloxidasen-Aktivität der Hämolymphe wurde in Zusammenarbeit mit W. Wagner über eine modifizierte Methode nach Jiang *et al.* (1998) und Wichers *et al.* (1984) durchgeführt. Die Methode beruht auf dem durch Phenoloxidasen katalysierten Umsatz von Dopamin mit Sauerstoff (luftgesättigte Lösungen) zu Dopaminchinon und Wasser. Die Hämolymphe wurde entweder unverdünnt verwendet (*M. melolontha*-Puppen und L2-Larven) oder 1:5 und 1:10 (*P. japonica*, *M. melolontha*-L3-Larven), 1:10 und 1:20 (*Galleria*-Larven) oder 1:20 und 1:30 (*Tenebrio*-Larven) mit Messpuffer (50 mM Na_3PO_4 , pH 7,0) verdünnt. Zur spektrophotometrischen Bestimmung der Enzymaktivität wurden 390 μl Messpuffer, 100 μl 2 mM Dopamin-Lösung (in Messpuffer) und 10 μl Probe (= entsprechende Verdünnung der Hämolymphe) gemischt und alle 20 sek die Extinktion bei 450 nm gemessen (3-5 min pro Messung). Die Enzymaktivität wurde über das Lambert-Beer-Gesetz ermittelt: $c = \Delta E/d\varepsilon = 0,435 \cdot \Delta E \cdot VF$ in $[\text{nmol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}]$, wobei c = Substratumsatz, d = 1 cm, VF = Verdünnungsfaktor, ε = Extinktionskoeffizient für Dopamin = $2298 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Wichers *et al.*, 1984). Pro Messung wurden 4-7 Wiederholungen durchgeführt ($T = 22 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

2.5 Modelle zur Beschreibung des Infektionsverhaltens

2.5.1 Modelle zur Beschreibung der Infektionsdynamik der Nematoden

Tab. 2.6. Parameter der Infektions-Modelle nach Bohan & Hominick (1995) und Anderson (1978a,b).

Parameter	Definition	Einheit/Numerik
N_0	Gesamt-Nematodenpopulation	[Nematoden]
α	Anteil infektiöser Nematoden	[%]
β	Penetrationsrate (Nematoden/Wirt pro Zeiteinheit)	[1/h]
$P(t)$	penetrierte Nematoden zum Zeitpunkt t	[Nematoden]
W	Anzahl Wirte	[Wirte]
t	Zeit nach der Nematoden-Applikation	[h]
I_0	penetrationsfähige Nematoden zum Zeitpunkt $t = 0$ (zum Zeitpunkt der Applikation)	[Nematoden]
$I(t)$	Zahl der zum Zeitpunkt t noch zur Penetration fähigen Nematoden (penetrationsfähige Nematoden außerhalb des Wirts)	[Nematoden]

Infektions-Modell nach Bohan & Hominick (1995)

Das Modell von Bohan und Hominick (1995) geht davon aus, dass sich eine Nematodenpopulation (N_0) aus einem Anteil infektiöser (α) und einem Anteil nicht-infektiöser ($1-\alpha$) Nematoden zusammensetzt. Nur der Anteil infektiöser Nematoden ist in der Lage einen Wirt (Insekt) zu penetrieren; αN_0 stellt somit die maximale Obergrenze der in den Wirt penetrierten Nematoden dar. Unter der Voraussetzung, dass die infektiösen Nematoden unabhängig voneinander agieren und mit der gleichen Wahrscheinlichkeit einen Wirt penetrieren, ergibt sich ein einfach-lineares Modell zur Beschreibung der Zunahme der Zahl penetrierter Nematoden mit der Zeit:

$$P(t) = \alpha \beta N_0 W t \quad (2.1)$$

Da $P(t)$ durch α begrenzt ist und die Zahl der zur Penetration noch fähigen Nematoden durch die bereits penetrierten Nematoden ($=\beta P(t) W t$) vermindert wird, muss dieser Anteil von $P(t)$ abgezogen werden; das Modell wird wie folgt erweitert:

$$P(t) = \alpha \beta N_0 W t - \beta P(t) W t \quad (2.2)$$

Nach Umformung ergibt sich:

$$P(t) = \frac{\alpha \beta N_0 W t}{1 + \beta W t} \quad (2.3)$$

Infektions-Modell nach Anderson (1978a,b)

Für das Infektionsmodell nach Anderson (1978a,b) gelten die gleichen Voraussetzungen wie bei Bohan & Hominick (1995), es werden jedoch zwei zusätzliche Parameter eingeführt (Tab. 2.6). Die Zahl der penetrierten Nematoden $P(t)$ und die Zahl der penetrationsfähigen Nematoden außerhalb des Wirts $I(t)$ in Abhängigkeit von der Zeit lassen sich in folgende Gleichungen fassen:

$$\frac{dI(t)}{dt} = -\beta I(t) \quad (2.4)$$

$$\frac{dP(t)}{dt} = \beta I(t) \quad (2.5)$$

Für die Differentialgleichung (2.4) ergibt sich folgende Lösung:

$$I(t) = I_0 e^{-\beta t} \quad (2.6)$$

Für die Zahl penetrierter Nematoden $P(t)$ zum Zeitpunkt t folgt

$$P(t) = I_0 - I(t) = I_0 - I_0 e^{-\beta t} = I_0 (1 - e^{-\beta t}) \quad (2.7)$$

Da $I_0 = \alpha N_0$ folgt aus (2.7)

$$P(t) = \alpha N_0 (1 - e^{-\beta t}) \quad (2.8)$$

Parameterschätzung

Die Schätzung des Parameters α erfolgte durch Auszählungen in entsprechenden Versuchen. Die Bestimmung des Parameters β erfolgte über das Statistikprogramm SigmaStat 2.03.

2.5.2 Modelle zur Beschreibung der Befallsstrategie der Nematoden

Tab. 2.7. Parameter der Verteilungsfunktionen (ϕ).

Variable	Definition	Einheit/Numerik
n	Zahl der behandelten Insektenlarven	[Insekten]
N	Zahl der applizierten Nematoden	[Nematoden]
m	Mittelwert der Zahl penetrierter Nematoden pro Insektenlarve	[Nematoden]
x	Zahl penetrierter Nematoden pro Insektenlarve	[Nematoden]

Negative Binomial-Verteilung – NBV (Bliss, 1953)

Die Negative Binomial-Verteilung ist durch zwei Parameter, die Wahrscheinlichkeit p ($0 < p < 1$) und den Exponenten k ($k > 0$), gekennzeichnet. Sie gibt die Häufigkeit des Auftretens von infizierten Insektenlarven mit x penetrierten Nematoden mit folgender erwarteter Verteilung an:

$$\phi(x) = n \binom{x+k-1}{x} p^x (1-p)^k \quad (2.9)$$

wobei $p = m/k =$ Wahrscheinlichkeit, dass ein Nematode eine Insektenlarve penetriert. Der Parameter m wird wie folgt geschätzt:

$$m = \frac{\sum fx}{n} \quad (2.10)$$

wobei f die beobachtete Häufigkeit für jede Zahl penetrierter Nematoden pro Insekt (x) darstellt. Der Parameter k ist mit dem Mittelwert m und dessen Varianz wie folgt korreliert (Bliss, 1953):

$$k = \frac{m^2}{s^2 - m} \quad (2.11)$$

Mit dieser Schätzung wird für kleine Werte von m wenn $k/m > 6$, bei mittleren Werten wenn $(k+m)(k+2)/m \geq 15$ und für große Werte von m wenn $k > 13$ eine 90%ige oder höhere Zuverlässigkeit der Näherung erreicht. Der Parameter k ist von der Nematoden-Dichte

abhängig und ein Maß für die Aggregation der Nematoden. Um im Rahmen der NBV statistisch zu prüfen, ob die Verteilung einer zufälligen oder einer aggregierten entspricht, wurde in Anlehnung an Westerman (1997) k durch zwei über das empirische Potenzgesetz von Taylor (1961) indirekt bestimmte Parameter wie folgt ausgedrückt:

$$s^2 = am^b \quad (2.12)$$

Nach Logarithmierung beider Seiten folgt $\ln s^2 = \ln a + b \cdot \ln m$ und mit Gl. (2.11) folgt

$$k = \frac{m}{am^{b-1} - 1} \quad (2.13)$$

Die Parameter a und b wurden über eine lineare Regressionsanalyse von $\ln s^2$ über $\ln m$ ermittelt. Wenn a und insbesondere der Exponent b nicht signifikant von 1 abweichen (t -Test, $\alpha = 0,05$), kann die Verteilung als zufällig angesehen werden.

Binomial-Verteilung – BV (Hay & Fenlon, 1995)

Die Binomial-Verteilung beschreibt die Verteilung von Ereignissen auf zwei mögliche und sich gegenseitig ausschließende Ausgänge („Erfolg“ versus „Misserfolg“) (Köhler *et al.*, 1996). Die Binomial-Verteilung ist durch die Wahrscheinlichkeit p ($0 < p < 1$) und den Exponenten x ($x \geq 0$) gekennzeichnet. Sie gibt die Häufigkeit des Auftretens von infizierten Insektenlarven mit x penetrierten Nematoden mit folgender erwarteter Verteilung an:

$$\phi(x) = n \binom{N}{x} p^x (1-p)^{n-x} \quad (2.14)$$

wobei $p = x/N =$ Wahrscheinlichkeit, dass ein Nematode eine Insektenlarve penetriert. In diesem Modell wird vorausgesetzt, dass die Penetrationswahrscheinlichkeit unabhängig von der Dosis (N) ist, d.h. $p = \text{konst.} = \sum x_i / \sum N_i$ und ein Diagramm, in dem x_i über N_i aufgetragen wird, sollte eine Ursprungsgerade ergeben.

Erweiterte Binomial-Verteilung – EBV (Hay & Fenlon, 1995)

Die Erweiterte Binomial-Verteilung geht davon aus, dass sich die Wahrscheinlichkeit der Erstpenetration eines Nematoden in eine Insektenlarve (p_1) von der Wahrscheinlichkeit der Zweit- und Folgepenetration weiterer Nematoden in die gleiche Insektenlarve (p_2) unterscheiden. Nach Anwendung des Multiplikationssatzes für Wahrscheinlichkeiten, erhält man folgende Verteilungsfunktion:

$$\phi(x) = n \frac{1 - (1 - p_1)^n}{1 - (1 - p_2)^n} \binom{N}{x} p^x (1 - p_2)^{n-x} \quad (2.15)$$

Die EBV wurde insbesondere mit der BV verglichen, um abzuschätzen, ob Insekten, in die bereits Nematoden penetriert sind, anfälliger für weitere Penetrationen sind.

Poisson-Verteilung – PV (Bliss, 1953)

Die Poisson-Verteilung beschreibt die Verteilung zufälliger Ereignisse mit einem Ausgang (Köhler *et al.*, 1996). Die NBV und die BV nähern sich für $k \rightarrow \infty$ bzw. für $N \rightarrow \infty$ einer Poisson-Verteilung. Die PV ist durch den Parameter m charakterisiert und gibt die Häufigkeit des Auftretens von Insektenlarven mit x penetrierten Nematoden wider:

$$\phi(x) = n \frac{m^x}{x!} e^{-m} \tag{2.16}$$

Der Parameter m wird wie bei der NBV geschätzt.

2.6 Selektion auf höhere Infektiosität und Bestimmung der Heritabilität

2.6.1 Allgemeine Definitionen

Heritabilität

Die Heritabilität („Vererblichkeit“) ist ein Populationsparameter zur Schätzung des Zuchtwerts eines bestimmten Merkmals einer Population. Sie ist definiert als das Verhältnis der genotypischen zur phänotypischen Varianz und wird mit h^2 symbolisiert (Schüler *et al.*, 2001). Allgemeine Definition der Heritabilität:

$$h^2 = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_d^2}{\sigma_g^2 + \sigma_u^2} = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_p^2} \tag{2.17}$$

σ_a^2	additive genetische Varianz
σ_d^2	Dominanzvarianz + Varianz durch Interaktionen
$\sigma_g^2 = \sigma_a^2 + \sigma_d^2$	genotypische Varianz
σ_u^2	umweltbedingte Varianz
$\sigma_p^2 = \sigma_g^2 + \sigma_u^2$	phänotypische Varianz

Im Gegensatz zu dieser Definition von h^2 ($= h_w^2 =$ Heritabilität im weiteren Sinne), gibt die Heritabilität im engeren Sinn (h_e^2) das Verhältnis der additiven genetischen Varianz zur phänotypischen Varianz an.

$$h_e^2 = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_p^2} \tag{2.18}$$

Die realisierte Heritabilität (h_r^2) wird aus Daten von Selektionsexperimenten berechnet und liegt meist zwischen h_w^2 und h_e^2 , da sie unabhängig von genetisch-statistischen Modellen ist.

Sie ist definiert als Quotient aus Selektionserfolg (SE) und Selektionsdifferenz (SD).

$$h_r^2 = \frac{SE}{SD} \quad (2.19)$$

Das Ziel einer künstlichen Selektion besteht in einer gerichteten genetischen Veränderung der Population. Der direkte Selektionserfolg ΔG ist definiert als die Differenz der Mittelwerte der Eltern- und Nachkommenpopulation und wird direkt anhand der Veränderungen des Selektionskriteriums (z.B. „höhere Infektiosität“) beschrieben. Es gilt:

$$\Delta G = h^2 SD \quad (2.20)$$

Die Selektion hat nicht nur einen Einfluss auf den Mittelwert eines Merkmals innerhalb der Population, sondern führt auch zu einer Verringerung der Varianz des Merkmals. Häufig sind mit Änderungen des eigentlichen Selektionsmerkmals Änderungen weiterer genetisch korrelierter Merkmale verbunden (indirekter Selektionserfolg).

Die Selektionsdifferenz ist eine Größe in der Dimension des Merkmals (z.B. mm, Anzahl). Da die Varianz (bzw. die Standardabweichung) eines Merkmals von Population zu Population variieren kann, wird die Selektionsdifferenz durch die Standardabweichung geteilt. Diese standardisierte Selektionsdifferenz wird als Selektionsintensität (i) bezeichnet.

$$i = \frac{SD}{\sigma_p} \quad (2.21)$$

Die Selektionsintensität (i) hängt nur von der Remontierungsrate (p), also dem Anteil selektierter Tiere (= Elternpopulation für die nächste Generation), ab.

Aus (2.20) und (2.21) ergibt sich

$$\Delta G = ih^2 \sigma_p \quad (2.22)$$

Die Heritabilität kann bei Selektionsexperimenten über mehrere Generationen auch über eine Regressionsanalyse ermittelt werden (Schüler *et al.*, 2001). Der Wert von h^2 entspricht dem Quadrat des Korrelationskoeffizienten $r_{G,P}$ zwischen den genotypischen (G) und phänotypischen (P) Werten. Dieser Wert wiederum entspricht dem Bestimmtheitsmaß (B).

Genetische und phänotypische Korrelation

Die genetische Korrelation beschreibt die Beziehung zweier abhängiger, metrischer Merkmale auf genetischer Ebene (Schüler *et al.*, 2001). Sie beruht auf der Eigenschaft eines Genes an der phänotypischen Merkmalsdetermination von mehr als einem Merkmal beteiligt zu sein (Pleiotropie) und auf der genetischen Kopplung von Genen auf den Chromosomen. Die genetische Korrelation wird durch den genetischen Korrelationskoeffizienten r_g beschrieben. Durch direkte Bestimmung der Beziehung zweier Merkmale erhält man den

phänotypische Korrelationskoeffizient r_p . Die phänotypische Kovarianz (cov_p) lässt sich in einen additiv-genetisch bedingten (cov_a) und einen umweltbedingten (cov_u) Anteil zerlegen: $cov_p = cov_a + cov_u$. Die Korrelation zweier Merkmale X und Y ist definiert als das Verhältnis der Kovarianz zu dem Produkt der Standardabweichungen der beiden Merkmale:

$$r_p = \frac{cov_p(X, Y)}{\sigma_{px} \sigma_{py}} \quad (2.23)$$

Aus (2.23) folgt $cov_p(X, Y) = r_p \sigma_{px} \sigma_{py}$ und damit $r_p \sigma_{px} \sigma_{py} = r_a \sigma_{ax} \sigma_{ay} + r_u \sigma_{ux} \sigma_{uy}$. Da $\sigma_a = h \sigma_p$ und $\sigma_u = e \sigma_p$ folgt $r_p = h_x h_y r_a + e_x e_y r_u$, wobei h die Wurzel des genetischen Anteils der phänotypischen Varianz (h^2) und e analog die Wurzel des umweltbedingten Anteils (e^2) ist. Für e_x^2 gilt daher $e_x^2 = 1 - h_x^2$ woraus folgt

$$r_p = h_x h_y r_a + \sqrt{1 - h_x^2} \sqrt{1 - h_y^2} \cdot r_u \quad (2.24)$$

Aus dieser Formel wird ersichtlich, dass die genetische Korrelation nicht allein durch die Bestimmung der phänotypischen Korrelation bestimmt werden kann.

2.6.2 Berechnung der Heritabilität aus den Selektionsversuchen

Die Heritabilität der Infektiosität bei den beiden untersuchten Nematodenarten gegenüber Larven des Feldmaikäfers wurde über eine lineare Regressionsanalyse ermittelt. Der Analyse liegt die in Schüler *et al.* (2001) angegebene Formel zugrunde:

$$h_r^2 = \frac{\sum_{i=1}^{k-1} E_{i+1}^* D_i^*}{\sum_{i=1}^{k-1} D_i^2} \quad (2.25)$$

$E_i^* = E_i - \bar{E}$	Differenz aus kumulativem (E_i) und mittlerem (\bar{E}) Selektionserfolg (SE)
$D_i^* = D_i - \bar{D}$	Differenz aus kumulativer (D_i) und mittlerer kumulativer (\bar{D}) Selektionsdifferenz (SD)
k	Anzahl Generationen (entspr. der Anzahl Selektionszyklen)
i	Index der i -ten Generation (entspr. dem i -ten Selektionszyklus)

Da von der 0-ten zur 1-ten Generation ein Wirtswechsel stattfand, wurden für die Regressionsanalyse die Daten der 0-ten Generation nicht berücksichtigt (Erhöhung der umweltbedingten Varianz). Da sich die Nematoden in einem Wirt mit mehreren Generationen vermehren, entspricht der Selektionszyklus nicht der Anzahl Generationen. Für die Berechnungen wurde jedoch der Selektionszyklus der Anzahl der Generationen gleichgesetzt, da jeweils nur in einer Generation (der von den applizierten Nematoden) die Selektion auf „höhere Infektiosität“ wirkte. Die Zwischengenerationen im Wirt wurden in Bezug auf das Selektionskriterium als selektionsneutral bewertet.

Die Bestimmung der phänotypischen Korrelationskoeffizienten r_p erfolgte über lineare Regressionsanalysen.

2.6.3 Berechnung der Heritabilität aus Versuchen mit Inzuchtlinien

Für die Berechnung der Heritabilität eines Merkmals innerhalb einer Inzuchtlinie gibt Falconer & Mackay (1996) folgende Formel an (vgl. Tab. 2.8):

$$h_t^2 = \frac{h_0^2(1 - F_t)}{1 - h_0^2 F_t} \quad (2.26)$$

h_t^2	Heritabilität des Merkmals innerhalb der Inzuchtlinie nach t Generationen
h_0^2	Heritabilität des Merkmals in der Ausgangspopulation
F_t	Inzuchtkoeffizient nach t Generationen

Tab. 2.8. Heritabilität nach Gl. (2.26) innerhalb einer Inzuchtlinie (h_7^2) bei einem Inzuchtkoeffizient von $F_7 = 0,992$ und drei verschiedenen Heritabilitäten in der Ausgangspopulation (h_0^2).

h_0^2	h_7^2
0,1	0,00089
0,5	0,00798
0,8	0,03101

Da h^2 nach Gl. (2.17) als Quotient aus genotypischer und phänotypischer Varianz definiert ist, folgt daraus, dass die genotypische Varianz (= additive genetische Varianz + Dominanzvarianz) innerhalb der Inzuchtlinien bei gleicher umweltbedingter Varianz nahezu null und damit vernachlässigbar ist. Dieser Effekt ist bei kleineren Werten für h^2 noch ausgeprägter als bei größeren (Gl. 2.26, Tab. 2.8). Für die genotypische Varianz einer Inzuchtlinie (InzL) ist demzufolge

$$\sigma_g^2(\text{InzL}) \approx 0 \text{ und damit } \sigma_p^2(\text{InzL}) = \sigma_g^2 + \sigma_u^2 \approx \sigma_u^2 \quad (2.27)$$

Die phänotypische Varianz innerhalb einer Inzuchtlinie entspricht folglich der umweltbedingten Varianz. Zur Berechnung der genotypischen Varianz der untersuchten Merkmale in der Ausgangspopulation wurde die Differenz der phänotypischen Varianz des Hybrid-Stammes PS7 (= Ausgangspopulation) zu jeder der 20 Inzuchtlinien berechnet (Schüler, 2002; pers. Mitteilung): $\sigma_p^2(\text{PS7-InzL}) = \sigma_p^2(\text{PS7}) - \sigma_p^2(\text{InzL}) = \sigma_g^2(\text{PS7}) + \sigma_u^2 - \sigma_p^2(\text{InzL})$.

Da $\sigma_p^2(\text{InzL}) \approx \sigma_u^2$ folgt $\sigma_p^2(\text{PS7-InzL}) = \sigma_g^2(\text{PS7})$. Die Heritabilität des Merkmals wurde dann wie folgt berechnet:

$$h^2(PS7) = \frac{\sigma_g^2(PS7)}{\sigma_g^2(PS7) + \sigma_u^2(PS7)} \quad (2.28)$$

Für die Berechnung der Heritabilität nach Gl. (2.28) wurden nur die positiven (≥ 0) Werte für $\sigma_p^2(PS7-InzL)$ verwendet. Bei den negativen Werten ist die Umweltvarianz der Inzuchtlinie größer als in der Ausgangspopulation. Aus allen Einzelberechnungen (Schätzungen) wurde das arithmetische Mittel, die Standardabweichung (s) sowie das 95% Konfidenzintervall als Schätzwert für h^2 des Merkmals in der Ausgangspopulation angegeben.

2.6.4 Berechnung der umweltbedingten Korrelation von Merkmalen

Der umweltbedingte Korrelationskoeffizient r_u wurde durch eine lineare Regressionsanalyse der Standardabweichung der zwei Merkmale (s_1 Merkmal 1 über s_2 Merkmal 2 bei jeder der 20 Inzuchtlinien) bei allen untersuchten Inzuchtlinien ermittelt. Dies ist möglich, da die phänotypische Varianz bei den Inzuchtlinien nach (2.29) der umweltbedingten Varianz entspricht. Der phänotypische Korrelationskoeffizient r_p wurde über lineare Regressionsanalysen bestimmt.

2.7 Statistik

2.7.1 Allgemeines

Im Ergebnisteil sind, wenn nicht anders erwähnt, die arithmetischen Mittelwerte mit dem Standardfehler (mittlerer Fehler, SE; engl. *standard error*) s/\sqrt{n} angegeben.

Bei Signifikanzprüfungen ist stets die Irrtumswahrscheinlichkeit α (Fehler 1. Ordnung – Ablehnung der Nullhypothese, obwohl sie zutrifft) sowie der jeweils durchgeführte statistische Test angegeben. Die Rohdaten wurden vor der Signifikanzprüfung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest auf Normalität geprüft ($\alpha = 0,05$). Die Varianzen wurden mit dem Levene-Median-Test auf Homogenität geprüft. Wenn der Test auf Normalität abgelehnt wurde, wurden die Daten in geeigneter Weise transformiert (arc sin-, log-, logit-, Quadratwurzeltransformation; Sachs, 1992) oder ein nichtparametrischer Test angewandt.

Die Mortalitäten wurden mit dem exakten Test nach Fisher ($n < 30$) oder mit dem Chi-Quadrat-Test ($n > 30$) auf Signifikanz geprüft.

Alle multiplen Mittelwertvergleiche wurden mit ungeplanten *a posteriori* Verfahren durchgeführt. Multiple Mittelwertvergleiche normalverteilter Daten wurden nach einer positiven ANOVA (mindestens zwei der geprüften Varianzen unterscheiden sich signifikant voneinander) bei gleichbesetzten Klassen (balancierter Fall = gleicher Stichprobenumfang für jede Testgruppe) mit dem Tukey-Test und bei nicht gleichbesetzten Klassen (unbalancierter Fall) mit dem Student-Newman-Keuls-Test durchgeführt (Köhler *et al.*, 1996). Wenn der Tukey-Test zwischen der Kontrollgruppe und der am stärksten abweichenden Testgruppe keine Signifikanz anzeigte, wurde der weniger konservative Duncan-Test angewandt. Multiple Mittelwertvergleiche nicht normalverteilter Daten wurden im balancierten Fall mit dem Tukey-Test für Ränge und im unbalancierten Fall mit dem Kruskal-Wallis-Test für Ränge (Verfahren nach Dunn) durchgeführt.

Alle paarweisen Mittelwertvergleiche wurden bei normalverteilten Daten mit dem *t*-Test nach Student und bei nicht normalverteilten Daten mit dem Mann-Whitney-U-Test für unverbundene und mit dem Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben durchgeführt.

Bei linearen Regressionsanalysen wurde der Regressionskoeffizient ermittelt und mit dem *t*-Test auf signifikanten Unterschied zu 0 geprüft. Die Korrelationen wurden mit einer ANOVA für Regressionsanalysen (F-Test) auf Signifikanz geprüft.

Zur statistischen Beurteilung der Eignung der mathematischen Modelle zur Beschreibung der jeweiligen Versuchsdaten wurde der Chi-Quadrat Anpassungstest (engl. *chi-square test for goodness of fit*) verwendet. Dieser Test ist eine Weiterentwicklung des G-Tests (engl. *log likelihood ratio test for goodness of fit*). Die Prüfstatistik des G-Tests ($G = 2 \ln (f/\phi)$; f = beobachtete, ϕ = erwartete Häufigkeit) nähert sich für große n ($n > 25$) der χ^2 -Verteilung (Sokal, 1981). Die erwartete Häufigkeit ϕ innerhalb einer Klasse soll > 5 sein. Die Prüfstatistik berechnet sich aus der Summe der Quotienten $(f-\phi)^2/\phi$ für alle Klassen.

Alle statistischen Berechnungen wurden mit den Statistik-Programmen SigmaStat für Windows (Version 2.03, 1992-97, SPSS Inc.) und Stat100 (Version 1.28, 1995-97, Biosoft) durchgeführt. Zur Darstellung von Diagrammen wurden die Programme SigmaPlot 2000 (Version 6.0, 1986-2000 SPSS Inc.) und Excel 2000 (1985-1999 Microsoft Corp.) verwendet.

2.7.2 Berechnung der LD- und LT-Werte

Die Berechnung der LD- und LT-Werte wurden über das Pharmakologische (Kooperative) Wirkungsmodell (Probit-Verfahren) und das Exponentielle (Unabhängige) Wirkungsmodell nach Peto (1953) durchgeführt (Huber & Hughes, 1984). Die Berechnungen wurden mit einem von Dr. Arne Peters (Fa E-Nema, www.e-nema.de) entwickelten Programm (Probitpc,

Version 2.00) durchgeführt. Die im Programm implementierte Test-Statistik (Chi-Quadrat-Test (FG, α)) prüft die Übereinstimmung der Versuchsdaten mit dem zugrundeliegenden Modell auf Signifikanz. Ergibt sich dabei ein signifikanter Unterschied, ist das Modell nur bedingt zur Beschreibung der Versuchsdaten geeignet. Die Mortalität in der unbehandelten Kontrollgruppe wurde nach der Methode von Abbott (1925) berücksichtigt.

Probit-Analyse

Bei diesem Verfahren werden die bei unterschiedlich hohen Dosierungen des zu prüfenden Pathogens ermittelten Mortalitäten zu Probits (*Probability Units*) oder Logits (*Logharitmic Units*) transformiert; die Dosis wird logarithmiert (\log_{10}) (ausführliche Darstellung in Finney, 1971). Durch die Transformationen erhält man eine lineare Beziehung zwischen der logarithmierten Dosis und den Probits/Logits der Mortalität. Die Parameterbestimmung der Regressionsgeraden (Steigung der Geraden und Schnittpunkt mit der Ordinate) erfolgt mit der Maximum-Likelihood Methode (z.B. Williams & Dye, 1994). Das Programm verrechnet alle eingegebenen Datensätze so, dass deren Probit-Geraden eine gemeinsame Steigung erhalten. Beim Vergleich verschiedener Behandlungen wird die relative Wirkung (engl. *relative potency*) r zu einem Referenzdatensatz ($r = 1$) angegeben, die den Faktor angibt, um welchen die zu vergleichende Behandlung eine höhere oder niedrigere Wirkung verursacht. Ein signifikanter Unterschied zweier Behandlungen liegt vor, wenn sich die 95% Konfidenzintervalle der LD_{50} -Werte nicht überschneiden ($\alpha = 0,05$).

Verfahren nach Peto (1953)

Peto (1953) hat aus Daten von bakteriellen Infektionen eine alternative Methode zur LD_{50} -Berechnung abgeleitet. Die Grundgedanken des Modells stammen von Druett (1952). Es wird postuliert, dass die Wahrscheinlichkeit, den Befall mit Bakterien zu überleben, wie folgt ist:

$$S = (1 - p)^n \cong e^{-pn} \quad (2.29)$$

S	Wahrscheinlichkeit des Überlebens der Versuchstiere (Überlebensquote)
p	Wahrscheinlichkeit, dass ein einzelner Keim keine Infektion hervorruft
n	Anzahl applizierter Keime (= Dosis)

Daraus leitet sich eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Überlebensquote und der Dosis ab: $\ln(S) = -pn$. Der Parameter p lässt sich mit der Maximum-Likelihood Methode schätzen und die LD_{50} ergibt sich dann aus $\ln(0,5) = -p \cdot LD_{50}$.

Die Verwendung dieses Modells wurde von Hay & Fenlon (1995) erstmals zur Beurteilung der Wirkung entomopathogener Nematoden bei Insekten vorgeschlagen.

2.8 Molekulare Methoden

2.8.1 DNA-Isolierung aus einem Nematoden-Pool

Die DNA-Isolierung aus einem Nematoden-Pool wurde mit dem QIAamp Tissue Kit (Protokoll „Mouse Tails“) oder dem GenElute Mammalian Genomic DNA Kit von Sigma durchgeführt. Dabei wurde wie folgt verfahren (Pufferangaben vom Sigma-Kit):

- Zentrifugieren der Nematoden (3 min, 10000 rpm), Überstand verwerfen
- 2 x Waschen mit sterilem Wasser, zentrifugieren (3 min, 10000 rpm), Überstand verwerfen
- 30-50 µl Nematoden-Pellet resuspendieren und in einem Glasmikrohomogenisator 5-10 min homogenisieren
- Homogenat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen, 180 µl Lysierungspuffer (B6678) und 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) dazugeben
- 2-4 h bei 55°C im Wasserbad inkubieren und alle 20 min vortexen
- 200 µl Lysierungspuffer (B8803) zugeben, vortexen, 10 min Inkubation bei 70°C
- 200 µl absoluten Ethanol dazugeben, vortexen
- Homogenat auf eine GenElute-Säule geben und auf ein Sammelgefäß stecken, zentrifugieren (1 min, 6500 rpm)
- Säule auf ein neues Sammelgefäß stecken, 500 µl Waschpuffer dazugeben, zentrifugieren (1 min, 6500 rpm)
- Säule auf ein neues Sammelgefäß stecken, 500 µl Waschpuffer dazugeben, zentrifugieren (3 min, 14000 rpm)
- Säule auf ein neues Sammelgefäß stecken, 200 µl Eluierungslösung dazugeben, 5 min bei Raumtemperatur inkubieren, zentrifugieren (1 min, 6500 rpm)
- Durchlauf nochmals auf die Säule geben und zentrifugieren (1 min, 6500 rpm)

Nach Bestimmung und Einstellung der Konzentration wurden die DNA-Lösungen aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Für diese und alle folgenden Versuche wurde demineralisiertes Wasser (18,3 Ω) aus einer Millipore-Anlage (Purification PAK) verwendet (20 min bei 121°C autoklaviert).

2.8.2 DNA-Isolierung aus Einzelnematoden

Die DNA-Isolierung aus oberflächensterilisierten Einzelnematoden erfolgte modifiziert nach Hashmi & Gaugler (1998). Dabei wurde wie folgt verfahren:

- Einzelnematode unter sterilen Bedingungen mit einer Nadel in 15 µl Lysierungspuffer auf einer Petrischale überführen und mit einer Nadel oder Kanüle zerstückeln
- Überführung in ein 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß
- 15 min Inkubation bei -70°C
- 1 h Inkubation bei 60°C (in PCR-Maschine)
- 15 min Inkubation bei 95°C (in PCR-Maschine)
- Abkühlung auf 4°C

Lysierungspuffer

Proteinase K (120 µg/ml)	50 µl
10 x PCR-Puffer mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (MBI Fermentas: 750 mM Tris-HCl, pH 8,8, 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% Tween 20)	10 µl
MgCl_2 (25 mM)	6 µl
Gelatine (0,5% w/v)	10 µl
Wasser	24 µl
Endvolumen	100 µl

Die Suspension jedes Einzelnematoden wurde in drei 5 µl Aliquots aufgeteilt. Zu jedem Aliquot wurde ein PCR-Master-Mix pipettiert (Endvolumen 25 µl, siehe unter ISSR-PCR).

2.8.3 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die DNA-Lösung wurde 1:40 in Wasser verdünnt. Die Absorption der verdünnten Lösung wurde bei 260 nm gemessen (Perkin Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda 2s). Die Konzentration der DNA wurde wie folgt berechnet:

$$c_{(\text{DNA})} [\mu\text{g/ml}] = \text{Absorption}_{260 \text{ nm}} \times 50 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

2.8.4 Allgemeines zur PCR

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction* - PCR) werden selektiv bestimmte Abschnitte der DNA exponentiell vermehrt (amplifiziert, engl. *amplify*) (Newton & Graham, 1994). In der Reaktion dienen Oligonucleotide (engl. *Primer*) als Startermoleküle für die Kettenreaktion; der von ihnen beidseitig flankierte DNA-Abschnitt wird in jedem Zyklus der Reaktion verdoppelt. Ein Zyklus besteht dabei aus drei Schritten: (1) Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA-Vorlage (engl. *Template*) bei 94°C (DNA wird in Einzelstränge aufgespalten), (2) Anlagerung der Primer (engl. *Annealing*) an die DNA-Einzelstränge bei einer spezifischen Temperatur, (3) Synthese des komplementären

DNA-Einzelstrangs (engl. *Extension*) bei der Arbeitstemperatur der DNA-Polymerase (72-75°C).

Den Zyklen wird meist eine 3-4 minütige Denaturierungsphase vorangestellt, damit die gesamte DNA in einzelsträngiger Form vorliegt. Die Extensionszeit des letzten Zyklus wird meist auf 5-10 min erhöht, damit alle PCR-Produkte vervollständigt werden können.

Die Wahl der richtigen Annealing-Temperatur ist für die Spezifität und damit für das Ergebnis der PCR entscheidend. Als Anhaltspunkt für die maximale Annealing-Temperatur (T_m) der Primer wurde eine empirische Formel verwendet (Newton & Graham, 1994): $T_m [^{\circ}\text{C}] = 4 \cdot (\text{C} + \text{G}) + 2 \cdot (\text{A} + \text{T})$. Die optimale Temperatur muss jedoch empirisch ermittelt werden.

PCR-Reagenzien und -Maschine

Die folgenden PCR-Reagenzien wurden von MBI Fermentas bezogen: MgCl_2 (25 mM), 10 x PCR-Puffer mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dNTPs (Mix aus je 2 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Taq DNA Polymerase (rekombinant, 1 u/ μl). Alle Primer für die RAPD- und die ISSR-PCR wurden von Interactiva Biotechnologie GmbH bezogen. Die PCRs wurden in einem BiometraTM TGradient Thermoblock (Biometra) mit Deckelheizung in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen mit flachem Deckel (Greiner oder Pequlab) durchgeführt.

2.8.5 RAPD-PCR (Random amplified polymorphic DNA – PCR)

In RAPD-PCR-Analysen werden kurze Zufalls-Primer (meist 10 Nucleotide lang) als Startermoleküle in der PCR eingesetzt. Da die Auswahl der Primer willkürlich erfolgt, wird das Verfahren auch „willkürlich gestartete PCR“ (*Arbitrarily primed PCR* - AP-PCR) genannt (Welsh & McClelland 1990; Newton & Graham, 1994). In der PCR wird in der Regel nur ein Primer eingesetzt. Es werden DNA-Abschnitte (100-4000 Basenpaare lang) amplifiziert, die zwischen zwei umgekehrt orientierten Primern liegen. Ein Vergleich mehrerer Analysen setzt die genaue Einhaltung gleicher Bedingungen voraus (vor allem gleiche Polymerase und PCR-Maschine). Von Vorteil ist, dass keine Kenntnisse der DNA-Sequenzen benötigt werden.

RAPD-Primer

Tab. 2.9. Die verwendeten RAPD-Primer und ihre Abkürzung. Die Auswahl der Primer richtete sich nach Hashmi *et al.* (1996).

Abkürzung	Sequenz 5' → 3'	Abkürzung	Sequenz 5' → 3'
A13	GAGGACCCAC	H04	GGAAGTCGCC
A18	AGGTGACCGT	H15	AATGGCGCAG
C06	GAACGGACTC	H18	GAATCGGCCA
C09	CTCACCGTCC	H19	CTGACCAGCC
C11	AAAGCTGCGG	S13	TTCGTTCCCTG
C12	TGTCATCCCC	S16	AGGGGGTTCC

RAPD-PCR-Ansatz

MgCl ₂ (25 mM)	1,2 µl
10 x PCR-Puffer mit (NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 µl
dNTPs (2 mM)	2,0 µl
Primer (10 pmol/µl)	3,75 µl
Template (1 ng/µl)	10,0 µl
Taq Polymerase (1 u/µl)	0,5 µl
Wasser	0,55 µl
Endvolumen	20,0 µl

PCR-Programm (Hashmi *et al.*, 1996)

1. Denaturierung	94°C	1 min
2. Annealing	40°C	2 min
3. Extension	72°C	3 min
39 Zyklen:		
4. Denaturierung	94°C	1 min
5. Annealing	40°C	1 min 30 sek
6. Extension	72°C	3 min
7. Ende	4°C	∞

Die Annealing-Temperatur wurde für alle Primer mit 40°C gleich gewählt. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung.

2.8.6 ISSR-PCR (*Inter simple sequence repeats* – PCR)

Bei der ISSR-PCR-Methode werden Primer benutzt, die zu den Sequenzen von Mikrosatelliten (auch „einfache Sequenzen“ - *simple sequence repeats* – SSRs oder *simple tandem repeats* – STRs - genannt) komplementär sind (Zietkiewicz *et al.*, 1994). Mikrosatelliten sind in Eukaryoten weit verbreitete und häufige Sequenz-Motive aus 2-6 Basenpaaren, die sich bis zu 100 mal wiederholen können (Tautz & Renz, 1984; Krawczak & Schmidtke, 1994). In der PCR wird analog zur RAPD-PCR-Methode in der Regel ein Primer eingesetzt, der jedoch meist 15-22 Nucleotide lang ist. Es werden DNA-Abschnitte in der Größenordnung von 50-3000 Basenpaaren amplifiziert. Auch hier sind keine Kenntnisse der DNA-Sequenz notwendig.

ISSR-Primer

Über die Verwendung von ISSR-Primern bei entomopathogenen Nematoden lagen keine Kenntnisse vor. Es wurden daher eine Reihe von Primern getestet (Tab. 2.10). Von diesen Primern wurden diejenigen, die mehrere PCR-Produkte erzeugten, durch das Hinzufügen von 2-5 weiteren Basen am 3' oder 5'-Ende modifiziert (= verankert, engl. *anchored*; Zietkiewicz *et al.*, 1994; Tab. 2.10). Dadurch wird gewährleistet, dass die Primer am Ende oder Anfang einer Mikrosatelliten-Sequenz anlagern und keine „unscharfen“ Banden auf dem Gel entstehen.

Tab. 2.10. Die in den Vorversuchen und in der eigentliche ISSR-PCR-Analyse verwendeten ISSR-Primer. K = G oder T, R = A oder G, Y = C oder T.

Vorversuche (5'→3')		eigentliche ISSR-PCR-Analyse (5'→3')	
Sequenz	Kurzschreibweise	Sequenz	Kurzschreibweise
3'-verankerte Primer			
GACACGACACGACAC	(GACAC) ₃	GACACGACACGACACYC	(GACAC) ₃ YC
ACGAACGAACGAACGA	(ACGA) ₄	ACGAACGAACGAACGAYC	(ACGA) ₄ YC
ACTGACTGACTGACTG	(ACTG) ₄	ACTGACTGACTGACTGYG	(ACTG) ₄ YG
GACAGACAGACAGACA	(GACA) ₄	GACAGACAGACAGACAKT	(GACA) ₄ KT
GATAGATAGATAGATA	(GATA) ₄	GACAGACAGACAGACAYC	(GACA) ₄ YC
GGATGGATGGATGGAT	(GGAT) ₄	TGTCTGTCTGTCTGTCTGTCRA	(TGTC) ₄ RA
TGTCTGTCTGTCTGTCTGTC	(TGTC) ₄	CAGCAGCAGCAGCAGYCT	(CAG) ₅ YT
AATAATAATAATAAT	(AAT) ₅	GTGGTGGTGGTGGTGYC	(GTG) ₅ YC
CAGCAGCAGCAGCAG	(CAG) ₅	GAGAGAGAGAGAGAGAYCTCA	(GA) ₈ YCTCA
GAAGAAGAAGAAGAA	(GAA) ₅	GAGAGAGAGAGAGAGARC	(GA) ₈ RC
GTGGTGGTGGTGGTG	(GTG) ₅	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	(GA) ₈ YC
TCCTCCTCCTCCTCC	(TCC) ₅	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	(GA) ₈ YG
TGTTGTTGTTGTTGT	(TGT) ₅	5'-verankerte Primer	
CACACACACACACACACA	(CA) ₁₀	CYGACAGACAGACAGACA	CY (GACA) ₄
CTCTCTCTCTCTCTCT	(CT) ₈	TKGACAGACAGACAGACA	TK (GACA) ₄
GAGAGAGAGAGAGAGA	(GA) ₈	ACTGYGAGAGAGAGAGAGAGA	ACTGY (GA) ₈
GCGCGCGCGCGCGCGC	(GC) ₈	CYGAGAGAGAGAGAGAGAGA	CY (GA) ₈
		GYGAGAGAGAGAGAGAGAGA	GY (GA) ₈

ISSR-PCR-Ansatz

DNA aus	Nemat.-Pool	Einzel-nemat.
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl	1,5 µl
10 x PCR-Puffer mit (NH ₄) ₂ SO ₄	2,5 µl	2,5 µl
dNTPs (2 mM)	2,5 µl	2,5 µl
Primer (10 pmol/µl)	5,0 µl	5,0 µl
Template (1 ng/µl oder Aliquot)	10,0 µl	5,0 µl
Taq Polymerase (1 u/µl)	1,0 µl	1,0 µl
Wasser	2,5 µl	7,5 µl
Endvolumen	25,0 µl	25,0 µl

PCR-Programm

1. Anfangs-Denaturierung	94°C	1 min
34 Zyklen:		
2. Denaturierung	94°C	45 sek
3. Annealing	45/52°C	1 min
4. Extension	72°C	2 min
5. Schluss-Extension	72°C	5 min
6. Ende	4°C	∞

Bei genomischer DNA von einem Einzelnematoden wurden 5 µl Aliquot des Lysierungsansatzes pro PCR eingesetzt (siehe 2.8.2), das Wasser-Volumen wurde entsprechend verändert. Die Annealing-Temperatur bei den nicht verankerten Primern betrug 45°C und bei den verankerten Primern 52°C. Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Silberfärbung.

Re-Amplifikation der DNA einzelner Banden bei der ISSR-PCR

Zur Isolierung der DNA einer Bande wurde diese mit einem sterilen Skalpell aus dem getrockneten Polyacrylamid-Gel ausgeschnitten und in 500 µl Wasser aufgenommen. Die Suspension wurde für 30 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert und mehrfach gevortext, damit die DNA in Lösung geht. Zur Re-Amplifizierung wurde in einer PCR 1 µl dieser

Lösung eingesetzt (das Wasservolumen wurde entsprechend angepasst). Als Primer wurde der gleiche Primer bzw. die gleiche Primer-Kombination wie in der ursprünglichen PCR eingesetzt. Das verwendete PCR-Protokoll entspricht dem der ISSR-PCR.

Kombination zweier ISSR-Primer

Bei der Primer-Kombination wurde jeder Primer in der halben Menge des Einzelansatzes verwendet (Cekic *et al.*, 2001). Zur Überprüfung, ob das PCR-Produkt von den beiden verschiedenen Primern flankiert war, wurden in den PCRs zur Re-Amplifizierung die Primer auch einzeln eingesetzt. Wenn das PCR-Produkt bei einem der beiden einzeln eingesetzten Primer nachzuweisen war, wurde die DNA nicht weiter untersucht. Der Nachweis der PCR-Produkte und die Überprüfung der Größe erfolgte durch eine Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung. Waren mehr als eine Bande auf dem Gel zu sehen, wurde die Bande mit der richtigen (erwarteten) Größe aus dem Gel geschnitten, die DNA extrahiert (siehe unten) und erneut in der PCR eingesetzt (1-2 µl). War nur die Bande der erwarteten Größe des PCR-Produkts auf dem Gel, wurde die DNA extrahiert und direkt für die Sequenzierung eingesetzt.

Die für die ISSR-PCR getesteten Primer-Kombinationen: (1) CY(GA)₈ und TK(GACA)₄, (2) CY(GA)₈ und (GACAC)₃YC, (3) (GACAC)₃YC und (ACTG)₄YG.

2.8.7 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen (Stamm XL1 blue) erfolgte modifiziert nach Hanahan *et al.* (1983):

- Ansetzen einer Übernachtskultur auf einer LB-Platte, Inkubation bei 37°C
- Mit einem sterilen Zahnstocher eine Kolonie in 1 ml LB-Medium überführen, vorsichtig vortexen, dann auf 20 ml LB-Medium in einem sterilen 100 ml-Kolben verdünnen
- Zellen 2-3 Stunden auf einem Schüttler (220 rpm) bei 37°C wachsen lassen, bis die Optische Dichte bei 550 nm 0,3 erreicht (alle 20-30 min kontrollieren)
- 2 ml der Kultur in einen sterilen 500 ml Kolben überführen, 40 ml LB-Medium zugeben
- Zellen 1-3 Stunden auf einem Schüttler (220 rpm) bei 37°C wachsen lassen, bis die Optische Dichte bei 550 nm 0,45 erreicht (alle 20-30 min kontrollieren)
- Kultur in eisgekühlte 50 ml Reaktionsgefäße (Falcon) überführen, 15 min auf Eis belassen
- Zentrifugation der gekühlten Kultur (10 min, 7000 rpm,) bei 4°C

- Dekantieren des Mediums und Resuspendieren des Bakterien-Pellets in 2 ml eisgekühltem TFB1 durch vorsichtiges Vortexen, anschließend mit eisgekühltem TFB1 auf 16 ml verdünnen, 15 min auf Eis belassen
- Zentrifugation der gekühlten Kultur (10 min, 7000 rpm,) bei 4°C
- Dekantieren des Mediums und Resuspendieren des Bakterien-Pellets in 1,6 ml eisgekühltem TFB2, 15 min auf Eis belassen
- Aliquotierung zu 100 µl in eisgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße (schnelles Arbeiten!)
- Lagerung der Aliquots bei -70°C

Transformations-Puffer

- **TFB1** (Transformation buffer)

MES ¹	10 mM
RbCl	100 mM
CaCl ₂ * 6 H ₂ O	10 mM
pH 5,8 einstellen mit 1 M NaOH	
danach zugeben: MnCl ₂ * 4 H ₂ O	50 mM

¹(2-(N-Morpholino)ethane sulfonic acid)

- **TFB2**

MOPS ¹	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl ₂ * 6 H ₂ O	75 mM
Glycerin	15% w/v
pH 6,5 einstellen mit 1 M NaOH	

¹Morpholinopropane sulfonic acid

TFB1 und TFB2 wurden nach Fertigstellung sterilfiltriert (Membra Pure, Ø 0,2 µm).

Medien (Sambrook *et al.*, 1989)

- **LB-Medium** (Luria Bertani)

Trypton	1% w/v	10 g
Hefe-Extrakt	0,5% w/v	5 g
NaCl	0,5% w/v	5 g
pH 7,0 einstellen mit 5 M NaOH		
mit Wasser auffüllen		ad 1000 ml

- **TY** (Tryptone Yeast)

Trypton	2% w/v	20 g
Hefe-Extrakt	0,5% w/v	5 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,51% w/v	5,1 g
NaCl	0,058% w/v	0,58 g
pH 7,0 einstellen mit 5 M NaOH		
mit Wasser auffüllen		ad 1000 ml

Die Medien wurden bei 121°C für 20 min autoklaviert. Beim Gießen von LB-Platten wurde zusätzlich 1,5% (w/v) Agarose zugegeben. LB-Medium mit Antibiotikum wurde durch Zugabe einer sterilfiltrierten Carbenicillin-Stammlösung (50 mg/ml, Lagerung bei -20°C) hergestellt (Endkonzentration = 100 µg/ml). Bei den LB-Platten wurde das Antibiotikum entweder mit einem Trigalski-Spatel auf der Oberfläche verteilt oder vor dem Gießen der Platten in das noch flüssige Medium (Temperatur < 50°C) gegeben.

Für die Blau/Weiß-Selektion der Bakterien nach der Transformation wurde auf der LB-Platte 200 µl flüssiges LB-Medium mit 40 µl X-Gal-Stammlösung und 4 µl IPTG-Stammlösung mit einem Trigalski-Spatel verteilt. Die Platten wurden bis zur vollständigen Adsorption der Lösung bei Raumtemperatur belassen.

Lösungen für die Blau/Weiß-Selektion

- **X-Gal** (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid) - Stammlösung
3% (w/v) X-Gal in DMSO (Dimethylsulfoxid), Lagerung bei -20°C
- **IPTG** (Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid) - Stammlösung
100 mM IPTG in Wasser, sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C

2.8.8 Ligation

Die Ligation (engl. *ligation* – Bindung) der PCR-Produkte in den pGEM[®]-T-Vektor erfolgte mit dem pGEM[®]-T Klonierungskit von Promega nach den Angaben des Herstellers bei 4°C über Nacht. Bei diesem Klonierungskit wird eine T/A-Klonierung durchgeführt. Dabei wird die Tatsache genutzt, dass viele DNA-Polymerasen an das 3'-Ende eines synthetisierten PCR-Fragments ein einzelnes, überhängendes Adenin-Nucleotid anfügen (3'-Adenylierungsaktivität; Müller, 2001). PCR-Produkte mit einem A-Überhang lassen sich in einen linearisierten Vektor mit T-Überhang ohne vorherige enzymatische Behandlung ligieren.

2.8.9 Transformation und Blau/Weiß-Selektion

Bei der Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen wurde wie folgt vorgegangen:

- 10 min auftauen lassen der kompetenten *E. coli*-Zellen auf Eis
- Zugabe von 4 μl des Ligationsansatzes zu 100 μl der kompetenten *E. coli*-Zellen, vorsichtig mischen
- 30 min auf Eis inkubieren, nicht schütteln
- 3 min bei 42°C in einem vorgewärmten Wasserbad inkubieren
- 2 min auf Eis abkühlen
- 1 ml TY-Medium (ohne Antibiotikum) zugeben
- 60 min auf einem Schüttler (220 rpm) bei 37°C inkubieren
- 200 μl der Bakterien-Suspension auf eine LB-Platte mit X-Gal und IPTG geben
- Platten bei Raumtemperatur belassen bis die Bakterien-Suspension adsorbiert ist
- Petrischalen mit Parafilm verschließen (kann auch entfallen), Platten umdrehen und über Nacht (12-16 h) bei 37°C inkubieren

Blau/Weiß-Selektion auf positive Klone

Nur diejenigen Bakterien, die ein Plasmid (pGEM[®]-T-Vektor) aufgenommen haben, besitzen eine durch β -Lactamase vermittelte Carbenicillin-Resistenz (analog für Ampicillin und Kanamycin). Die Plasmide enthalten das *lacZ*-Gen, welches β -Galactosidase kodiert. Die Expression dieses Gens wird durch das Lactoseanalogon IPTG induziert. Die β -Galactosidase spaltet X-Gal in den blauen Farbstoff 5-Bromo-4-Chlorindigo und die Zuckerkomponente Allolactose. Durch das Einbinden der Fremd-DNA innerhalb des *lacZ*-Gens auf dem Plasmid kann keine β -Galactosidase mehr gebildet werden. Dadurch kann keine Spaltung von X-Gal erfolgen und die Kolonien entsprechender Klone verfärben sich nicht blau. Nur weiße Kolonien enthalten daher ein Plasmid mit der ligierten Fremd-DNA. Von jeder Transformation wurden drei weiße *E. coli*-Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher in ein steriles Reagenzglas mit 5 ml LB-Medium + Antibiotikum überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht (12-16 h) bei 37°C auf einem Schüttler (250 rpm).

Zur Verwahrung von Klonen wurden 400 μ l der Übernachtskultur mit 100 μ l sterilem Glycerin gemischt (leichtes vortexen) und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen bei -70°C aufbewahrt.

2.8.10 Isolierung von Plasmiden (Minipräp)

Von der Übernachtskultur in flüssigem LB-Medium wurden die Plasmide mit dem QIAprep Minipräp Kit von Qiagen nach den Angaben des Herstellers isoliert. Zur Überprüfung, ob das richtige Insert (= die DNA der entsprechenden Bande auf dem Gel nach der ISSR-PCR) in den Vektor aufgenommen wurde, erfolgte eine PCR mit den Primern T7 und SP6. Die PCR-Produkte wurden nach einer Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung durch einen Größenvergleich identifiziert. Als Template in der PCR wurde 1 μ l der Plasmid-Lösung (aus der Minipräp) verwendet. Entsprach die Größe des Inserts der erwarteten Größe, wurde die Plasmid-Lösung direkt für die Sequenzierung verwendet.

PCR zur Überprüfung des Inserts

MgCl ₂ (25 mM)	1,2 μ l
10 x PCR-Puffer mit (NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 μ l
dNTPs (2 mM)	1,2 μ l
Primer T7 (10 pmol/ μ l)	1,0 μ l
Primer SP6 (10 pmol/ μ l)	1,0 μ l
Template	1,0 μ l
Taq Polymerase (1 u/ μ l)	1,0 μ l
Wasser	11,6 μ l
Endvolumen	20,0 μ l

PCR-Programm

1. Denaturierung	94°C	2 min
2. Annealing	50°C	2 min
3. Extension	72°C	3 min
31 Zyklen:		
4. Denaturierung	94°C	1 min
5. Annealing	50°C	1 min
6. Extension	72°C	3 min
7. Ende	4°C	∞

2.8.11 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte durch eine Fluoreszenz-Terminationsreaktion in einem Thermocycler von ABI (ABI 310) und anschließende Analyse der Produkte in einer Sequenziermaschine (ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer).

Reaktionsansatz für BigDye Terminations-Sequenzierung mit AmpliTaq FS:

Premix (Puffer, dNTPs, Fluoreszenz-ddNTPs, AmpliTaq FS)	2 µl
DNA-Template	1-7,5 µl
Sequenzierungsprimer (5-10 pmol)	0,5-1 µl
Mit Wasser auffüllen	ad 10 µl

Bei PCR-Produkten bis 1 kb Länge wurde der Premix-Anteil auf 1 µl halbiert.

Richtlinien für die Konzentration der DNA-Templates: doppelsträngiges PCR-Produkt: 100-200 bp – 1-3 ng, 200-500 bp – 3-10 ng, 500-1000 bp – 5-20 ng, doppelsträngige Plasmid-DNA: 5 kb – 300-600 ng.

Als Sequenzierungsprimer dienten bei direkter Sequenzierung der PCR-Produkte die jeweils in der ISSR-PCR eingesetzten Primer. Bei den Klonierungsprodukten wurden die Primer T7 und SP6 (Sequenzen des RNA Polymerase Promoters; T7 - TAATACGACTCACTATAGGG, SP6 - ATTTAGGTGACACTATAG; MBI Fermentas) verwendet. Nach der Terminationsreaktion wurden die Proben durch eine Ethanol-Fällung für die Sequenzierung vorbereitet.

Programm für die Fluoreszenz-Terminationsreaktion:

1. Anfangs-Denaturierung	96°C	5 min
25 Zyklen:		
2. Denaturierung	96°C	10 sek
3. Annealing	50°C	5 sek
4. Extension	60°C	4 min
6. Ende	4°C	∞

Ethanol-Fällung (Durchführung bei Raumtemperatur!)

- Zugabe von 5 µl 3 M NaAc (pH 5,0), 30 µl Wasser und 125 µl 100% EtOH
- 15 min bei > 15000 rpm zentrifugieren
- Ethanol-Überstand abnehmen und mit 250 µl 70% EtOH waschen
- 5 min bei > 15000 rpm zentrifugieren
- Überstand entfernen und Pellet für etwa 10 min trocknen lassen
- Pellet in 15-25 µl Wasser lösen und 2 min bei 90°C inkubieren
- auf Eis abkühlen

Sequenzvergleiche

Ein Vergleich der erhaltenen Sequenzen mit Sequenzen aus Datenbanken erfolgte mit dem Internet-Programm BLAST (*Basic local alignment search tool*; <http://www.dove.embl-heidelberg.de/Blast2>; Altschul, 1990). Die eingegebenen Nucleinsäure- oder Proteinsequenzen werden mit Sequenzen der Datenbank 'GenBank' des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) verglichen. Das Programm gibt Sequenzen mit der höchsten Übereinstimmung an. Ist die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Übereinstimmung sehr klein ($< 10^{-6}$), ist von einer Sequenzhomologie auszugehen.

2.8.12 Agarose-Gelelektrophorese

Analytisches Gel

Die Agarose-Gele waren 1%ig (1% w/v Agarose in 1 x TAE). Pro Tasche wurden 5-10 μ l Probe + 1-2 μ l 5 x Ladepuffer aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 7-8 V/cm durchgeführt. Die Gele wurden 15-20 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (5 μ g/l in 1 x TAE) gefärbt und anschließend auf einer UV-Platte bei 254 nm betrachtet. Die Dokumentation der Gele erfolgte mit dem Dokumentations-System BioDocAnalyse, Version 1.0 (Biometra). Als DNA-Größenmarker diente, wie bei der dPAGE auch, der „GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus“ von MBI Fermentas.

Präparatives Gel – Extraktion von DNA

Bei präparativen Gelen wurden je zwei Taschen mit einem Klebeband überklebt, so dass bis zu 60 μ l aufgetragen werden konnten. Die Elektrophorese erfolgte wie oben aufgeführt. Die Bande mit der zu extrahierenden DNA wurde ausgeschnitten und die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von QIAGEN nach den Angaben des Herstellers extrahiert. Die DNA-Konzentration wurde durch eine erneute Gelelektrophorese und Vergleich der Bandenstärke mit dem MassRuler (MBI Fermentas) abgeschätzt.

Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989)

- TAE 50 x (Tris *Acetic acid* EDTA)

Tris (Roth)	2 M	243,3 g
EDTA ¹ (Roth)	50 mM	18,6 g
pH 8,0 mit Eisessig einstellen		
mit Wasser auffüllen		ad 1000 ml

¹ *Ethylendiamin-tetraacid*

- Ladepuffer 5 x

Glycerin (Roth)	50% v/v
SDS ¹ (Roth)	0,2% w/v
Xylencyanol FF (Serva)	0,05% w/v
Bromphenolblau (Serva)	0,05% w/v
in 5 x TAE ansetzen	

¹ *Sodium dodecyl sulfate*

2.8.13 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (dPAGE)

Die Gele waren 45 cm hoch, 20 cm breit und 0,4 mm dick. Zum Abdichten wurden die Kanten der Glasplatten mit Tesa-Klebeband (4 cm breit) abgeklebt. Die Platzhalter (engl. *Spacer*) und Kämme (Haifischzahnkamm, 38 Taschen) wurden von Sigma bezogen.

Ansatz für ein denaturierendes Polyacrylamidgel (Sequenzgel, 6%)

Harnstoff	40 g
Wasser	55,25 ml
TBE 10 x	8 ml
Rotiphorese 30	16,75 ml
APS ¹	500 µl
TEMED ²	50 µl
Gesamtvolumen	≈ 112 ml

¹ Ammoniumpersulfat ² N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

Der Harnstoff wurde in Wasser, 10 x TBE und der Rotiphorese 30-Lösung (enthält 37,5% Acrylamid und 0,8% w/v Bisacrylamid, Roth) gelöst. Die Übersättigung mit Harnstoff bewirkt die Denaturierung der DNA (Martin, 1996). Die Lösung wurde 20-30 min entgast. Nach dem Zugabe von APS und TEMED wurde sofort das Gel gegossen. Die Gele wurden mit einem wassergetränktem Papierhandtuch und einer Frischhaltefolie vor Austrocknung geschützt. Die Polymerisation erfolgte über Nacht bei 4-6°C oder für 3-4 h bei Raumtemperatur. Das APS (10% w/v in Wasser) wurde frisch angesetzt und höchstens einige Tage bei 4-6°C aufbewahrt.

Behandlung der Glasplatten

Nach jedem dritten Gebrauch wurden die Glasplatten, auf denen das Gel haften sollte (Platte ohne Ohren) für 1 h in eine Silanisierungslösung gelegt (plusone Bind-Silane, Pharmacia Biotech). Danach wurden die Platten mit destilliertem Wasser abgespült und getrocknet. Die Glasplatten wurden vor jedem Gebrauch gründlich gespült und mit einem in 70%igem Ethanol getränkten, fusselreien Tuch (Kimwipes) abgerieben. Die Ohrenplatten wurden vor jedem Gebrauch mit einem Antihafmittel besprüht und eingerieben (BlueSlick Repellent, Serva).

Elektrophorese

Die Proben wurden mit Formamid-Ladepuffer vermengt (3 µ Probe + 2 µl Ladepuffer), 5 min auf 95°C erhitzt und dann auf Eis gekühlt. Die Taschen wurden unmittelbar vor dem Beladen mit 1 x TBE ausgespült (Entfernung von Harnstoff) und dann mit 5 µl beladen. Die

Elektrophorese erfolgte bei 1500 V (28-33 V/cm), 23-30 mA und 50-54 W für etwa 2-3 h. Um zu verhindern, dass die in der Mitte des Gels aufgetragenen Proben schneller durch das Gel laufen („Smiling-Effekt“ durch die stärkere Erwärmung des Gels in der Mitte) wurde an die Ohrenplatte über die gesamte Fläche eine zugeschnittene Styroporplatte angelegt. An den Rand der Platte ohne Ohren wurde auf jede Seite eine etwa 6 cm breite Styroporplatte angelegt (am Rand der Glasplatte angelegt und zur Mitte der Platte hin 2-3 cm abstehend).

Puffer für die dPAGE (Sambrook *et al.*, 1989)

- **TBE 10 x** (Tris Borsäure EDTA)

Tris (Roth)	890 mM	108 g
Borsäure	890 mM	55 g
EDTA (Roth)	20 mM	0,744 g
pH 8,0		
mit Wasser auffüllen		ad 1000 ml

- **Ladepuffer**

Formamid	80% v/v
EDTA (Roth)	10 mM
pH 8,0	
Xylencyanol FF (Serva)	0,1% w/v
Bromphenolblau (Serva)	0,1% w/v

Silberfärbung der Polyacrylamidgele

Die Silberfärbung erfolgte modifiziert nach Charters *et al.* (1996). Jeweils zwei Glasplatte mit dem anhaftenden Gel (Gel nach oben) wurden in die Färbewanne gelegt. Die absoluten Angaben in Klammern beziehen sich auf 2 l. Wenn nicht anders erwähnt, sind alle Prozentangaben in w/v. Die folgenden Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt:

- **Fixieren und Waschen** ⇒ 30 min
 - EtOH (vergällt) 15% (v/v) (300 ml)
 - Eisessig 5% (v/v) (100 ml)
 - ⇒ 2 x 10 min Waschen mit destilliertem Wasser
- **Silberlösung** (frisch ansetzen!) ⇒ 30 min
 - AgNO₃ 0,2% (2 g)
 - Formaldehyd 0,037% (2 ml)
- **Waschen (wichtiger Schritt)**
 - ⇒ etwa 2 x 8 s in destilliertem Wasser waschen (nicht zu lang!)
- **Entwickeln** ⇒ 3-6 min
 - Na₂CO₃ 2,5% (50 g)
 - Formaldehyd 0,037% (2 ml)
 - Na₂S₂O₅ 0,0015-0,002% (1-2 ml)

Das Natriumthiosulfat wird in Form einer 2%igen Stammlösung zugegeben (zunächst 1 ml), dann wurde ein Tropfentest durchgeführt: 50 µl Silberlösung + 50 µl Entwickler. Der

Tropfen sollte sich erst nach 5 s schwarz gefärbt haben; traf dies nicht zu, wurde weiteres Natriumthiosulfat zugegeben (jeweils 100 µl) und erneut ein Tropfentest durchgeführt.

- **Stopplösung** ⇒ 20 min
- Glycin 2% (0,04 g)
- EDTA 0,5% (0,01 g)
- ⇒ Lufttrocknung über Nacht

Für eine kontrastreiche Färbung sollte der Reinheitsgrad des Natriumcarbonats unbedingt > 99,9% sein. Zur Dokumentation wurden die Gele eingescannt (Umax PowerLook II, 300 dpi).

2.8.14 Datenanalyse

Die Ähnlichkeit der Bandenmuster nach elektrophoretischer Auftrennung der RAPD- und ISSR-PCR-Produkte der DNA zweier Arten/Stämme (allgemein: Taxa) ist ein Hinweis auf deren Verwandtschaftsgrad. Um die Bandenmuster aller untersuchten Taxa vergleichen zu können, wurde es in eine 1/0-Matrix überführt, wobei die 1 für eine vorhandene und die 0 für eine nicht vorhandene Bande auf gleicher Höhe des Gels steht (z.B. Weising *et al.*, 1995; Huang & Sun, 2000). Das Vorhandensein/Fehlen eines DNA-Abschnitts definierter Länge wird als ein Merkmal des Taxons gewertet. Dabei wird vorausgesetzt, dass amplifizierte DNA-Abschnitte gleicher Länge (bei dem selben Primer in der PCR) mit hoher Wahrscheinlichkeit homologe DNA-Abschnitte bei den zu vergleichenden Taxa darstellen (Wägele, 2000).

Zur Auswertung von ISSR-PCR-Analysen und weiteren aktuellen Informationen zu dieser Methode siehe auch <http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html>.

Wahl der Außengruppe bei der Erstellung der Dendrogramme

Bei der Erstellung von Dendrogrammen wird meist eine Außengruppe als Referenzgruppe gewählt und der Innengruppe (ausgewählte Gruppe von Arten, deren Monophylie geprüft werden soll) gegenübergestellt. Dadurch erhalten die Dendrogramme eine Polarität (meist „Wurzelung“ genannt) und eine Leserichtung (Wägele, 2000).

In Analogie zu Liu *et al.* (1997) und Liu *et al.* (1999) wurde in vorliegender Arbeit *C. elegans* als Außengruppe definiert. Die Nematodenart *C. elegans* wurde bei allen RAPD- als auch bei den ISSR-PCR-Analysen mit untersucht. Die Art wird zur Familie der Rhabditidae gerechnet, die zur selben Ordnung (Rhabditida) wie die beiden untersuchten Familien Heterorhabditidae und Steinernematidae gehört (Blaxter *et al.*, 1998), ist jedoch kein Insekten-pathogener Parasit.

Erstellung der Dendrogramme

Die Erstellung der Dendrogramme (= Stammbaumdiagramm; weitere synonyme Begriffe hierfür sind Phylogramm, Kladogramm oder Baumgrafik) wurde mit dem Programm PAUP*4.0b4a (*Phylogenetic analysis using parsimony * and other methods*; Swofford, 1993) durchgeführt. Die Dendrogramme wurden mit dem Programm TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) importiert (Page, 1996). Zur Erstellung der Dendrogramme wurden das Maximum-Parsimony- sowie zwei Distanz-Verfahren (Neighbour-joining und UPGMA) angewandt.

Maximum-Parsimony-Verfahren (MP-Verfahren)

Das Maximum-Parsimony-Verfahren (engl. *parsimony* – sparsam) sucht nach der einfachsten (sparsamsten) Erklärung eines gegebenen Merkmal-Datensatzes. Das Verfahren besteht in der heuristischen (bei kleinen Datensätzen auch einer exakten) Suche nach der Baumtopologie, welche die geringste Anzahl Merkmalsänderungen (= evolutive Schritte) erfordert (Wägele, 2000); das Ergebnis entspricht dem „kürzesten Baum“. Durch das MP-Verfahren erhält man im günstigsten Fall einen einzigen Baum. Werden mehrere gleich kurze Bäume gefunden, wird meist ein Konsensus-Baum angegeben, der durch verschiedene Verfahren ermittelt werden kann. In dieser Arbeit wurden 50% *majority-rule* Konsensus-Bäume dargestellt.

Distanzverfahren

Mit Distanzverfahren werden die Merkmale von jeweils zwei Taxa verglichen und die Unterschiede gezählt. Ein Maß für die Distanz ist der Quotient der Anzahl Unterschiede durch die Gesamtzahl berücksichtigter Merkmale. Dieser Quotient wird als sichtbare Distanz (*p*-Distanz) bezeichnet. Ein Maß für die Ähnlichkeit (engl. *similarity*) ist dementsprechend der Anteil gemeinsamer Merkmale. Nach Nei & Li (1979) gilt:

$$S = \frac{2n_{xy}}{n_x + n_y} \quad \text{und} \quad p = 1 - S \quad (2.33)$$

wobei n_{xy} der Zahl gemeinsamer Merkmale (= Banden auf dem Gel) der Arten X und Y und n_x bzw. n_y der Zahl der Merkmale (= Banden auf dem Gel) der Art X bzw. Y entspricht. S entspricht dem Anteil gemeinsamer Merkmale (= *similarity coefficient* nach Nei & Li, 1979 oder *similarity index* nach Weising *et al.*, 1995). Die berechneten Distanzen aller paarweisen Vergleiche (bei k zu vergleichenden Arten sind $k(k-1)/2$ Vergleiche möglich) werden in eine Matrix überführt. Die Distanzmatrix wird entweder unverändert oder nach Transformation zu evolutionären Distanzen (*d*-Distanz, abhängig vom zugrundeliegenden Evolutionsmodell) mit

einem Clusterverfahren in ein Dendrogramm umgesetzt. Die Erstellung der Dendrogramme beruht ausschließlich auf den Distanzen, Merkmalszustände werden nicht berücksichtigt.

Neighbor-Joining-Verfahren

Das Neighbor-Joining-Verfahren (Clusterverfahren) wurde von Saitou & Nei (1987) vorgestellt. Aus allen paarweisen Distanzvergleichen wird das Paar mit der geringsten Distanz (= nächster Nachbar, engl. *nearest neighbor*) verknüpft und mit einem neuen mittleren Distanzwert versehen. Das Paar wird nun als taxonomische Einheit (engl. *operational taxonomic unit* - OTU) in der erneuten Berechnung aller paarweisen Distanzen berücksichtigt. Aus der neuen Distanzmatrix wird wiederum das Paar mit der geringsten Distanz verknüpft. Das Verfahren wird solange fortgesetzt, bis alle Taxa im Dendrogramm eingefügt sind. Diese Methode setzt keine ultrametrischen Distanzen voraus, die Taxa dürfen also unterschiedliche Evolutionsraten aufweisen.

UPGMA-Verfahren (*Unweighted pair group method using arithmetic averages*)

Das UPGMA-Verfahren (Clusterverfahren) setzt ultrametrische Distanzen voraus, es wird also eine gleiche Evolutionsrate für alle Taxa angenommen (ultrametrische genetische Distanz = genetische Distanz, die der Divergenzzeit proportional ist; Wägele, 2000). Die *p*-Distanzen für das UPGMA-Verfahren wurden nach Nei & Li (1979) berechnet (siehe oben).

Bootstrap-Test (Wiederfindungswahrscheinlichkeitstest)

Der Bootstrap-Test ist ein statistisches Verfahren um zu prüfen, wie gut die Übereinstimmung des berechneten Dendrogramms mit der zugrunde liegenden Datenstruktur ist (Felsenstein, 1985). Die Werte des Tests (in Prozent) geben an, wie oft eine Verzweigung (ein Monophylum) in Dendrogrammen wiederzufinden ist, die mit Modifikationen des ursprünglichen Datensatzes gewonnen wurden (Wiederfindungswahrscheinlichkeit). Dabei werden aus dem ursprünglichen Datensatz zufällig Merkmale (Spalten) ausgewählt und zu einem neuen Datensatz gleichen Umfangs zusammengestellt. Durch dieses Verfahren fehlen im neuen Datensatz einige Merkmale und andere treten doppelt oder mehrfach auf. Für jeden dieser Datensätze (häufig 100 oder 1000) wird mit dem jeweiligen Verfahren ein Dendrogramm erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Screening verschiedener Nematodenarten und -stämme

Die Larven des Feld- und Waldmaikäfers sowie des Junikäfers sind gegenüber den meisten entomopathogenen Nematodenarten relativ unempfindlich. Das *Screening* verschiedener Nematodenarten und -stämme auf Wirksamkeit gegenüber diesen Larven diente dazu, möglichst effiziente Stämme zu finden, die als potentielle Kandidaten für eine biologische Bekämpfung in Frage kommen. Zum Vergleich wurde die Wirksamkeit der Nematoden bei Larven des Mehlkäfers und der Großen Wachsmotte untersucht.

Tab. 3.1. Wirksamkeit verschiedener Nematodenarten und -stämme gegen L3-Larven des Feld- und Waldmaikäfers, des Junikäfers (jeweils 1000 Nematoden pro Larve im Testsystem I nach 28 Tagen; n = 20) sowie Larven des Mehlkäfers und der Großen Wachsmotte (jeweils 20 Nematoden pro Larve im Testsystem II nach 5 Tagen, n = 72) bei externer Applikation. *M.m.* = *Melolontha melolontha*; *M.h.* = *Melolontha hippocastani*; *A.s.* = *Amphimallon solstitialis*; *T.m.* = *Tenebrio molitor*; *G.m.* = *Galleria mellonella*; n.u. = nicht untersucht.

Nematodenart	Stamm	Mortalität (%) ± SE				
		Insektenart				
		<i>M.m.</i>	<i>M.h.</i>	<i>A.s.</i>	<i>T.m.</i>	<i>G.m.</i>
<i>Steinernema glaseri</i>	NC	62 ± 17	10 ± 5	80 ± 20	95 ± 5	95 ± 5
	RS92	80 ± 20	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
	NJH	85 ± 15	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
<i>S. sp.</i>	Devil	60 ± 20	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
<i>S. arenaria</i>	-	10 ± 5	20 ± 10	0	n.u.	n.u.
<i>S. feltiae</i>	Neudorff	0	0	0	n.u.	n.u.
<i>S. sp.</i>	E	3 ± 3	0	0	95 ± 5	90 ± 10
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	HK3	30 ± 10	0	0	72 ± 5	76 ± 5
	HDO	15 ± 5	0	n.u.	63 ± 3	92 ± 7
	IH127	5 ± 3	n.u.	n.u.	49 ± 5	57 ± 5
	H06	n.u.	0	n.u.	n.u.	n.u.
	T	15 ± 5	n.u.	n.u.	29 ± 3	93 ± 7
	MOL	n.u.	0	0	n.u.	n.u.
	BRE	n.u.	n.u.	n.u.	51 ± 5	93 ± 7
	HP88	25 ± 10	n.u.	n.u.	36 ± 5	93 ± 7
	BAY	25 ± 10	n.u.	n.u.	56 ± 5	93 ± 7
	HYB	26 ± 12	5 ± 3	6 ± 3	45 ± 5	70 ± 5
	RW	20 ± 10	n.u.	n.u.	43 ± 5	81 ± 5
	PS7	10 ± 5	n.u.	n.u.	42 ± 5	90 ± 7
	MB2	15 ± 5	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
<i>H. megidis</i>	HN1	n.u.	n.u.	n.u.	60 ± 5	83 ± 5
	HSH3	n.u.	n.u.	n.u.	40 ± 5	82 ± 5
	HSH2	20 ± 10	n.u.	n.u.	56 ± 5	79 ± 5
	NLH	n.u.	n.u.	6 ± 3	64 ± 5	93 ± 7
	HW79	10 ± 5	n.u.	30 ± 10	n.u.	n.u.
<i>H. marelatus</i>	-	20 ± 10	10 ± 5	n.u.	n.u.	n.u.

Aus Tab. 3.1 geht hervor, dass sich die Wirksamkeiten einzelner Nematoden-Stämme gegenüber Larven der Maikäfer erheblich unterscheiden. Die drei Stämme der Art *S. glaseri* erreichten mit Mortalitäten von 62-85% die höchste Wirksamkeit gegen *M. melolontha*-Larven (L3). Der Mittelwert der erreichten Mortalitäten war $76 \pm 7\%$. Die Stämme der Art *H. bacteriophora* erzielten dagegen Mortalitäten von 5-30%. Der Mittelwert war $19 \pm 3\%$ und damit signifikant kleiner als bei *S. glaseri* (*t*-Test, $\alpha < 0,001$). Gleiches gilt für die zwei getesteten *H. megidis*-Stämme (Mittelwert = $15 \pm 5\%$). Das *Steinernema*-Isolat aus Marokko (= *S. sp.* Stamm „Devil“) erreichte eine Mortalität von etwa 60% und war somit ähnlich gut wirksam wie die *S. glaseri*-Stämme.

Larven des Feldmaikäfers (*M. melolontha*) waren gegenüber allen getesteten Nematoden-Stämmen empfindlicher als die Larven des Waldmaikäfers (*M. hippocastani*). Der Mittelwert der erreichten Mortalität von allen Nematoden-Stämmen war bei *M.m.*-Larven $27 \pm 6\%$ und bei *M.h.*-Larven mit $5 \pm 2\%$ signifikant kleiner (Mann-Whithney-U-Test, $\alpha < 0,001$). Bei den Larven des Junikäfers (*A. solstitialis*) war der Mittelwert der Mortalitäten mit $14 \pm 9\%$ ebenfalls signifikant kleiner als bei *M.m.*-Larven. Lediglich *S. glaseri* (NC) und *H. megidis* (HW79) erzielten bei *A.s.*-Larven relativ hohe Mortalitäten von 80% bzw. 30%.

Tenebrio- und *Galleria*-Larven sind keine Bodenbewohner, ihre Anfälligkeit gegenüber EPN ist daher erwartungsgemäß höher als bei Scarabaeiden-Larven. Aufgrund der unterschiedlichen Dosierungen (1000 im Vergleich zu 20 applizierten Nematoden) ist ein direkter statistischer Vergleich unter Berücksichtigung von jeweils nur einer Dosierung nicht sinnvoll (vgl. aber mit den LD₅₀-Bestimmungen in Abschnitt 3.3.1). Bei *H. bacteriophora* reicht die Bandbreite der Mortalitäten bei *Tenebrio*-Larven von 29-72% (Mittelwert = $49 \pm 4\%$) und bei *Galleria*-Larven von 57-93% (Mittelwert = $84 \pm 4\%$), während *H. megidis* bei *Tenebrio*-Larven 40-64% (Mittelwert = $55 \pm 5\%$) und bei *Galleria*-Larven 79-93% (Mittelwert = $84 \pm 4\%$) erreicht. Die Mittelwerte der Mortalitäten zwischen den *Tenebrio*- und *Galleria*-Larven unterscheiden sich bei beiden Nematodenarten signifikant voneinander (*t*-Test, $\alpha < 0,001$). Bei *Steinernema* liegt die Mortalität sowohl für *Tenebrio*- als auch für *Galleria*-Larven im Bereich von 90-100% (Mittelwert = $94 \pm 4\%$) und damit signifikant höher als bei den *Heterorhabditis*-Arten (Mann-Whithney-U-Test, $\alpha < 0,001$).

Zwischen den Wirksamkeiten der einzelnen Nematoden-Stämme bei den vier Insektenarten besteht keine signifikante Korrelation (lineare Regression der Mortalitäten von jeweils zwei der untersuchten Larven, Diagramme sind nicht dargestellt).

3.2 Wirksamkeit der Nematoden bei Rickettsien-Befall der Engerlinge

In einer Engerling-Population (überwiegend L2-Larven) des Waldmaikäfers (*M. hippocastani*) wurde 1999 ein starker Befall durch den intrazellulären „Parasit“ *Rickettsiella popilliae* festgestellt. Die Symptome des als „Lorscher Krankheit“ (Niklas, 1960) bekannten Rickettsien-Befalls waren bei 38% der L2-Larven und bei 33% der L3-Larven deutlich zu erkennen. Um zu prüfen, ob diese im fortgeschritteneren Stadium erkrankten Tiere anfälliger gegenüber Nematoden sind und ob sich Nematoden in erkrankten Tieren vermehren können, wurden die L2-Larven sorgfältig in „gesunde“ (= ohne sichtbare Symptome der Lorscher Krankheit) und „kranke“ (= deutlich sichtbare Symptome) Tiere getrennt. Die Wirksamkeit von *H. bacteriophora* bei externer Applikation von 1000 Nematoden wurde dann bei gesunden und kranken Larven getestet (n = 30). Zur Kontrolle wurden gesunde Tiere (n = 59) und kranke Tiere ohne Nematodenbehandlung (n = 30) untersucht. Für die analogen Versuche mit L3-Larven von *M. hippocastani* standen lediglich 5 kranke und 8 gesunde Tiere zur Verfügung. Zusätzlich wurde das Vermehrungspotential von *H. bacteriophora* in gesunden und kranken L2-Larven bestimmt.

Lassen sich Rickettsien durch die Nematoden übertragen?

In einem weiteren Versuch sollte geprüft werden, ob die Nematoden, die sich in mit Rickettsien befallenen Larven entwickelten, in der Lage sind, Rickettsien zu übertragen und eine Rickettsien-Infektion auszulösen. Für diese Versuche wurden *M. melolontha*-Larven (L3) verwendet (völlig gesunde Engerling-Population aus Obergrombach, siehe Tab. 2.1). Die Nematoden, die sich in kranken Larven vermehrt hatten, wurden im Biotest extern appliziert (1000 Nematoden pro Larve) und infizierte Larven wurden auf Rickettsien-Befall überprüft. Zum Vergleich wurde das Homogenat einer kranken Larve oder von Nematoden aus kranken Larven an gesunde Larven verfüttert (jeweils 10 µl). Die Nematoden wurden vor der Homogenisierung oberflächensterilisiert um sicher zu gehen, dass nur Rickettsien, die sich im Inneren des Nematoden befanden, verfüttert wurden. Zur Verfütterung wurde die Suspension direkt zwischen die Mandibeln der Larve pipettiert; in der Regel nahm die Larve die Flüssigkeit ohne weiteres auf. Die so behandelten Larven wurden in einem Zeitraum von 90 Tagen auf Symptome der Lorscher Krankheit überprüft. Neben dem lichtmikroskopischen (Zeiss Inversionsmikroskop; Ölimmersion mit Phasenkontrast, 1000fache Vergrößerung) wurde zum Teil auch ein elektronenmikroskopischer (Zeiss, EM-10; 16-63000fache Vergrößerung) Nachweis der Rickettsien durchgeführt. Der elektronenmikroskopische Nachweis erfolgte mittels einer Negativkontrastierung der zu prüfenden Suspension

(Hämolymphe/Homogenat) mit einer 0,5-2%igen Uranylacetatlösung (Plattner & Zingsheim, 1987).

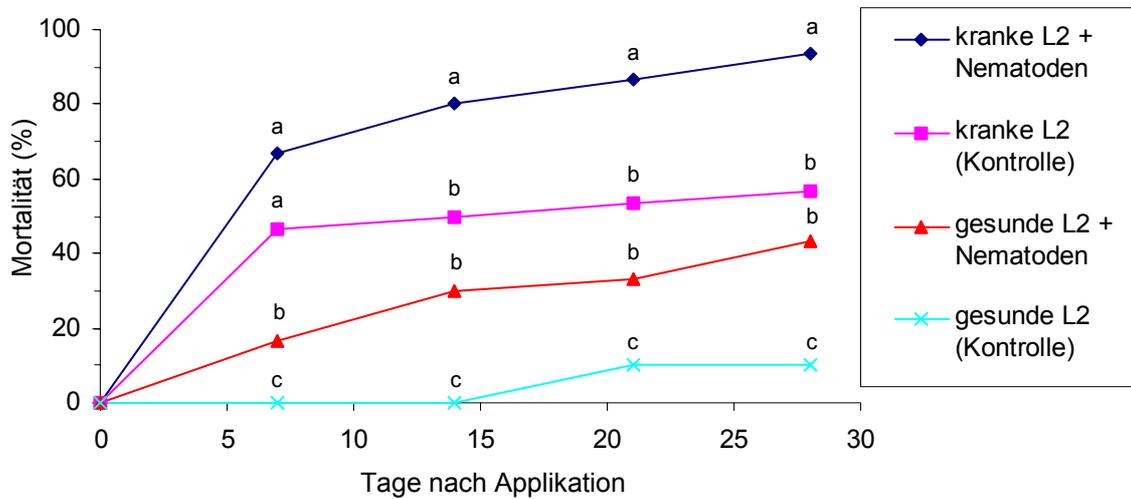
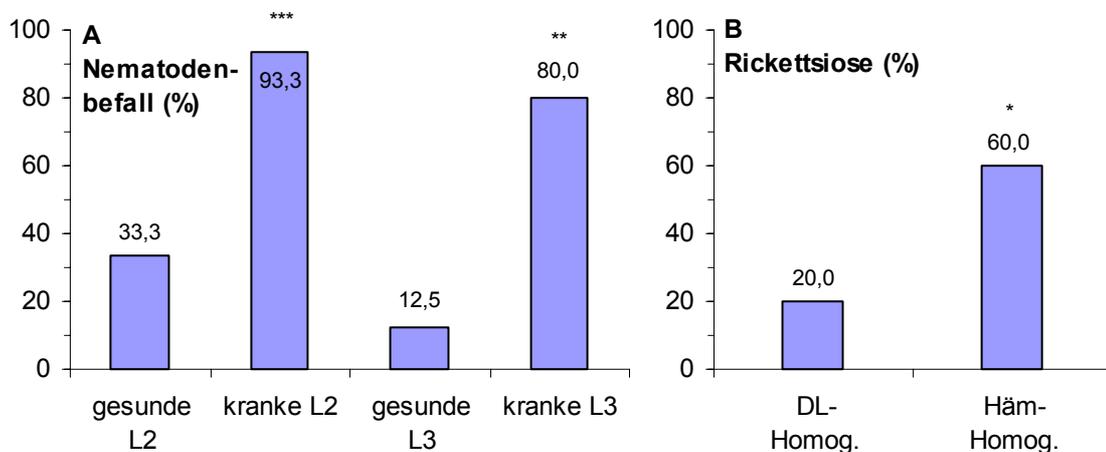


Abb. 3.1. Einfluss einer Vorinfektion durch Rickettsien auf die Mortalität von *M. hippocastani*-Larven (L2) nach externer Applikation von 1000 Nematoden von *H. bacteriophora* (HYB) im Testsystem I. Gewicht der *M.h.*-Larven (L2): $0,412 \pm 0,021$ g. Die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichneten Werte innerhalb eines Zeitpunkts unterscheiden sich signifikant voneinander (Chi-Quadrat-Test, $\alpha < 0,05$).



3.2. A. Vergleich der Mortalität von mit Rickettsien befallenen (= „kranken L2/L3“) und gesunden *M. hippocastani*-Larven (L2 und L3) bei externer Applikation von 1000 Nematoden von *H. bacteriophora* (HYB) nach 35 Tagen im Testsystem II (Vergleich der Mortalitäten bei den L2 mit dem Chi-Quadrat-Test und bei den L3 mit dem Exakten Test nach Fisher). **B.** Prozentsatz von *M. melolontha*-Larven (L3) mit Symptomen der Lorsch Krankheit 70 Tage nach Verfütterung eines Homogenats von Dauerlarven (DL-Homog.), die aus kranken Larven (*M.h.*-L2) gewonnen wurden, oder nach Verfütterung eines Homogenats einer kranken *M.h.*-L2-Larve (Häm-Homog.; Exakter Test nach Fisher). Gewicht der *M.m.*-Larven (L3): $1,954 \pm 0,067$ g. Die mit * gekennzeichneten Werte unterscheiden sich signifikant voneinander (* = $\alpha < 0,1$; ** = $\alpha < 0,05$; *** = $\alpha < 0,01$).

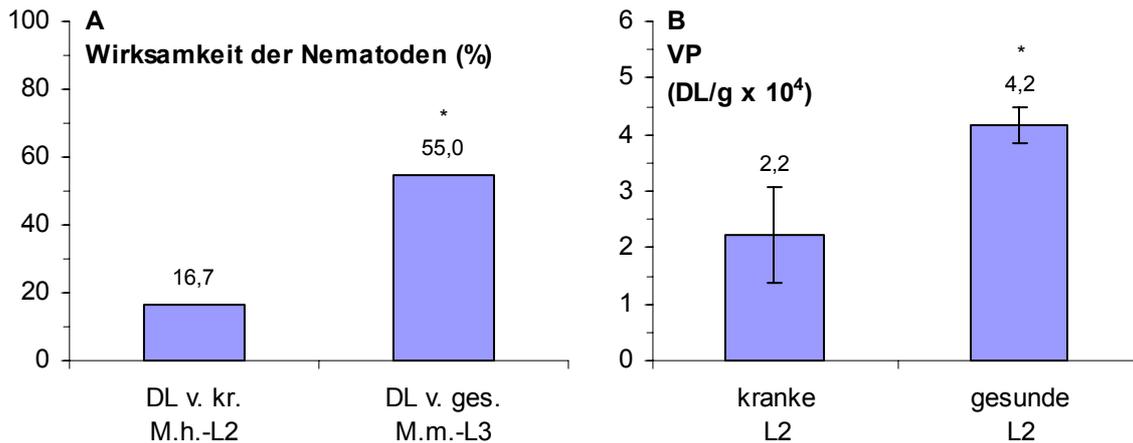


Abb. 3.3. A. Vergleich der Wirksamkeit gegen *M. melolontha*-L3-Larven im Testsystem II nach externer Applikation von 1000 Nematoden, die aus kranken *M.h.*-L2-Larven oder aus gesunden *M.m.*-L3-Larven gewonnen wurden (Chi-Quadrat-Test). Gewicht der *M.m.*-Larven (L3): $1,953 \pm 0,117$ g. **B.** Mittleres Vermehrungspotential (VP) von *H. bacteriophora* in kranken und gesunden *M. hippocastani*-Larven (L2) (*t*-Test). Gewicht der *M.h.*-Larven (L2): $0,412 \pm 0,021$ g. Die mit * gekennzeichneten Werte unterscheiden sich signifikant voneinander ($\alpha < 0,05$).

Aus Abb. 3.1 und 3.2 A geht hervor, dass die mit Rickettsien befallenen L2- und L3-Larven von *M. hippocastani*-Larven nach externer Applikation von *H. bacteriophora* (HYB) eine signifikant höhere Mortalität als kranke Larven ohne Applikation von Nematoden bzw. gesunde Larven mit Applikation von Nematoden aufweisen. Der Zeitverlauf der Mortalität bei kranken Larven, die mit Nematoden behandelt wurden, zeigt in etwa einen Verlauf, der sich aus der Addition der Mortalitäten der Kontrollgruppe aus kranken Larven ohne Nematoden-Applikation und aus gesunden Larven mit Nematoden-Applikation ergibt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass ein synergistischer Effekt der Wirkung des Rickettsien-Befalls auf die Wirksamkeit der Nematoden besteht. Die mit Nematoden befallenen kranken Larven zeigten eine deutlich hellere Rotfärbung als die mit Nematoden befallenen gesunden Larven. In der Hämolymphe der mit Nematoden befallenen kranken Larven waren die symbiotischen Bakterien und hohe Dichten der Rickettsien nachzuweisen. Bei allen vier Vergleichsgruppen der Abb. 3.1 war ein durch Pilzbefall verursachter Ausfall von etwa 3% zu beobachten (bei dem Pilz handelte es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um den entomopathogenen Pilz *Metarhizium anisopliae*). Die kranken L2-Larven wiesen bis zum Ende des Versuchs eine Mortalität von etwa 57% auf. Diese vergleichsweise hohe Mortalität ist sicherlich zum Teil durch den Stress, der für die Tiere während des Sammelns und der Labor-Haltung entstand, bedingt. Der Stress und die fortgeschrittene Rickettsien-Infektion wirkten offensichtlich synergistisch.

Die Nematoden konnten sich zwar in den mit Rickettsien befallenen *M. hippocastani*-Larven (L2) vermehren, allerdings mit einem signifikant geringerem Ausmaß (etwa der Hälfte) als in gesunden Larven (Abb. 3.3 B). Die Wirksamkeit (= „Infektiosität“) der Nematoden, die sich in kranken L2-Larven vermehrt hatten, war im Vergleich zu Nematoden, die sich in gesunden *M. melolontha*-Larven (L3) vermehrt hatten, gegenüber gesunden *M. melolontha*-Larven (L3) signifikant geringer (Abb. 3.3 A). Das geringere Vermehrungspotential in kranken Larven und die geringere Wirksamkeit der Nematoden aus kranken Larven weisen darauf hin, dass die Nematoden durch die Konkurrenz der Rickettsien beeinträchtigt werden und in ihrer Entwicklung quantitative als auch qualitative Einbußen erfahren.

Bei den *M. melolontha*-Larven, die von Nematoden aus kranken Larven befallen wurden, konnten Rickettsien in der Hämolymphe nachgewiesen werden. Die symbiotischen Bakterien überwogen jedoch bei weitem. Eine Übertragbarkeit („Verschleppung“) der Rickettsien durch die Nematoden scheint demnach möglich zu sein, nicht jedoch die Verursachung einer Rickettsien-Infektion, da die Rickettsien durch die schnelle Vermehrung der symbiotischen Bakterien überwachsen werden.

Bei der Verfütterung eines Homogenats von Nematoden aus kranken Larven wiesen nach 70 Tagen 20% der *M. melolontha*-Larven (L3) typische Symptome der Lorsch Krankheit auf, während nach Verfütterung eines Homogenats einer kranken *M. hippocastani*-Larve (L2) 60% Symptome aufwiesen (Abb. 3.2 B). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Nematoden aus kranken Larven potentiell genügend Rickettsien enthalten, um eine Infektion auszulösen. Bei oraler Aufnahme des Nematoden-Homogenats besteht für die Rickettsien keine Konkurrenz durch die symbiotischen Bakterien, da diese im Darmsystem ihre pathogene Wirkung nicht entfalten können (Berner, 1999; unveröffentlicht); für Rickettsien ist dies jedoch der natürliche Infektionsweg. Die signifikant höhere Infektionsrate nach Verfütterung eines Homogenats einer kranken Larve entspricht den Erwartungen, da die Hämolymphe einer kranken Larve Rickettsien in hoher Konzentration enthält.

3.3 Infektionsbiologie I – LD₅₀-Bestimmungen

Zur näheren Charakterisierung der Infektionsbiologie wurden die Nematodenarten *Heterorhabditis bacteriophora* (HYB) und *Steinernema glaseri* (NC) ausgewählt und vergleichend untersucht. Diese beiden Arten hatten in den Biotests beträchtlich unterschiedliche Wirksamkeiten gegenüber den getesteten Käferlarven (vgl. Abschnitt 3.1).

Die Untersuchungen sollten die Gründe hierfür im Hinblick auf die Befallsstrategien der Nematoden aufklären und Hinweise auf Abwehrmechanismen der Käferlarven geben. Die daraus abgeleiteten Kenntnisse sollten zur Interpretation der Ergebnisse der Selektion über Wirtspassagen sowie zur Entwicklung geeigneter Selektionsstrategien beitragen. Trotz eingeschränkter Übertragbarkeit auf Freilandverhältnisse, liefern die Ergebnisse wichtige Anhaltspunkte zur ökologischen Beurteilung der Nematoden sowie zur Beschreibung von Rahmenbedingungen für Freilandapplikationen.

Die Bestimmung der LD₅₀ (*Lethal dosis* = Lethale Dosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben) und der LT₅₀ (*Lethal time* = Zeit bis 50% der Versuchstiere gestorben sind) wurden bei externer Applikation, bei oraler und hämocoaler Injektion der Nematoden und bei hämocoaler Injektion der symbiotischen Bakterien durchgeführt.

3.3.1 Infektiosität bei externer Applikation

Die Infektiosität der Nematoden bei externer Applikation wurde ermittelt, indem Nematoden direkt in die Erde des Zuchtbehälters mit den Insektenlarven eingebracht wurden. Bei *M. melolontha*-Larven wurden vergleichende Untersuchungen mit dem L2- und dem L3-Larvenstadium sowie dem Puppenstadium (nur eine Nematoden-Dosis) durchgeführt (Testsystem I). Parallel hierzu wurden entsprechende Versuche mit *Tenebrio*-Larven durchgeführt (Testsystem I und II). Es wurden jeweils die LD_{50/90} und teilweise die LT₅₀-Werte ermittelt. Die in diesem Abschnitt dargestellten Ergebnisse umfassen auch die Daten der analog durchgeführten Versuche mit den selektierten Nematoden-Linien (vgl. Kapitel 3.5).

Neben dem Einfluss der Selektion, wurde der Einfluss des Vermehrungswirts der Nematoden sowie des Bodensubstrats auf die Wirksamkeit untersucht. Bei den Biotests mit *M. melolontha*-Larven wurden folgende Dosierungen verwendet: *H.b.* – 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000 Nematoden pro Engerling, *S.g.* - 8, 16, 32, 64, 100-125, 250, 500, 1000 Nematoden pro Engerling (n = 10-20, 1-2 Wiederholungen pro Dosis). Bei den *Tenebrio*-Larven waren die Dosierungen bei beiden Nematodenarten gleich: 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80, 160 Nematoden pro Larve (n = 32-40, 3-4 Wiederholungen pro Dosis). Alle Ergebnisse sind in Tab. 3.2 zusammengefasst.

Aus Tab. 3.2 geht hervor, dass sich die LD₅₀-Werte bei externer Applikation von *H. bacteriophora* signifikant von den Werten für *S. glaseri* unterscheiden. Der Ausgangsstamm

von *S. glaseri* (NC) besitzt gegenüber *M. melolontha*-Larven (L3) eine um den Faktor 10-12 höhere Wirkung als der Ausgangsstamm von *H. bacteriophora* (HYB). Die wesentlich höhere Infektiosität von *S. glaseri* gegenüber *Melolontha*-Larven ist ein Hinweis auf ein begrenztes Wirtsspektrum bzw. eine Wirtsspezifität dieser Nematodenart.

In der Wirkung gegenüber *Tenebrio*-Larven besteht kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Nematoden-Stämmen. Die bei *Tenebrio*-Larven ermittelten LD₅₀-Werte liegen außer beim Bodensubstrat Lehm (siehe unten) in einem wesentlich engeren Bereich, etwa zwischen 1-7 Nematoden pro Larve, als bei *M. melolontha*-Larven mit etwa 27-5000 Nematoden pro Larve. Die LD₅₀-Werte bei *Tenebrio*-Larven unterscheiden sich daher nicht signifikant (Tab. 3.2). Dies beweist, dass *Tenebrio*-Larven sehr viel anfälliger für eine Nematoden-Infektion sind als *Melolontha*-Larven (vgl. Abschnitt 3.3.1). Unterschiede in der Wirksamkeit einzelner Nematoden-Stämme sind anhand von Biotests mit *Tenebrio*-Larven daher schwerer erkennbar (vgl. auch Tab. 3.1). Im Gegensatz zu Scarabaeiden-Larven dürften *Tenebrio*-Larven kaum Abwehrmechanismen gegenüber EPN ausgebildet haben, da sie unter natürlichen Bedingungen nicht im Bodensubstrat vorkommen.

Die Selektionslinie H1-14 von *H. bacteriophora*, die durch 14 Selektions- und Vermehrungszyklen in *M. melolontha*-Larven entstand (siehe Kapitel 3.5), zeigte im Vergleich zum Ausgangsstamm (HYB) nur gegenüber *M. melolontha*-L2-Larven eine um den Faktor 3 höhere Wirksamkeit (nicht signifikant), während gegenüber L3-Larven in etwa die gleiche Wirksamkeit erzielt wurde. Die Selektionslinie S2-10 von *S. glaseri*, die nach 10 Selektions- bzw. Vermehrungszyklen in *M. melolontha*-Larven erhalten wurde (vgl. Kapitel 3.5), hatte im Vergleich zum Ausgangsstamm (NC) nur gegenüber *M. melolontha*-L3-Larven eine um den Faktor 15-17 höhere Wirksamkeit (signifikant). Bei *M. melolontha*-L2-Larven bestand kein Unterschied. Bei allen getesteten Linien beider Nematodenarten sind die LD₅₀-Werte bei L2-Larven signifikant geringer: bei *H. bacteriophora* etwa um den Faktor 4 und bei *S. glaseri* um den Faktor 16. Für diese Vergleiche wurden eigene Probit-Analysen mit den jeweils kombinierten Biotest-Daten für die L2- und L3-Larven der Nematoden-Stämme *H.b.* HYB und H1-14 sowie *S.g.* NC und S2-10 durchgeführt. Die höhere Empfindlichkeit kann darauf beruhen, dass sich die L2-Larven in einem späten Stadium und daher unmittelbar vor der Häutung zum L3-Stadium befanden. Etwa 10% der Larven häutete sich noch während des Versuchs (siehe auch unter „Wirksamkeit in Abhängigkeit vom Larvenstadium“ weiter unten).

Die Vermehrung der Nematoden in *M. melolontha*-Larven bewirkte sowohl bei *H. bacteriophora* als auch bei *S. glaseri* eine Erhöhung der Wirksamkeit (Tab. 3.2). Bei *H.*

bacteriophora zeigte die in *M. melolontha*-Larven vermehrte Selektionslinie H1-14 eine um den Faktor 5-6 signifikant höhere Wirksamkeit als bei Nematoden, die sich in *Galleria*-Larven vermehrt hatten. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Linie H1-14 vor der Vermehrung in *M.m.*-Larven einmal in *Galleria*-Larven zwischenvermehrt wurde. Bei *S. glaseri* (NC) war die Wirksamkeit nach Vermehrung in *M.m.*-Larven signifikant um den Faktor 12 höher als nach Vermehrung in *Galleria*-Larven. Der Vermehrungswirt der Nematoden kann demzufolge einen Einfluss auf die Wirksamkeit und damit auch die Qualität der Nematoden-Charge haben. Bei der Selektionslinie S2-10 von *S. glaseri* (vgl. Abschnitt 3.5.1) war jedoch kein Unterschied zwischen beiden Vermehrungswirten feststellbar. Mögliche Ursachen hierfür werden im Diskussionsteil besprochen (Abschnitt 4.5.8).

Tab. 3.2. Vergleich der berechneten LD₅₀- und LD₉₀-Werte bei externer Applikation der Nematoden. Die Berechnungen wurden mit dem Programm Probitpc, Version 2.0, von Dr. Arne Peters durchgeführt. Weichen die Versuchsdaten nicht signifikant (n.s.) von den Modellwerten ab, ist das zugrundeliegende Modell zur Beschreibung der Daten geeignet; bei signifikanter Abweichung (s.) ist das Modell nur bedingt geeignet (Chi-Quadrat-Test = χ^2 ; * = $\alpha < 0,05$; ** = $\alpha < 0,01$; *** = $\alpha < 0,001$). LD₅₀-Werte, die mit mindestens einem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Chi-Quadrat-Test, $\alpha < 0,05$). Die Signifikanzprüfungen wurden nur innerhalb einer Rubrik mit gemeinsamen Referenzwert (relative Wirkung = 1,000) durchgeführt. FG = Freiheitsgrad; LS = Larvenstadium; TS = Testsystem; VW = Vermehrungswirt; KI = Konfidenzintervall; n.m. = Berechnung nicht möglich; DL = Dauerlarven.

Insektenart (LS) / TS	Boden- substrat	Nematoden- Stamm	VW	Probit-Analyse						Analyse nach Peto (1953)						
				LT ₅₀ [d]	LD ₅₀ [DL]	LD ₅₀ 95% KI	rel. Wirk.	LD ₉₀ [DL]	χ^2	LD ₅₀ [DL]	LD ₅₀ 95% KI	rel. Wirk.	LD ₉₀ [DL]	FG	χ^2	
<i>M. melolontha</i> (L3) TS I	Standard	<i>H.b.</i> HYB	<i>G.m.</i>	16,5	4765c	2852-7961	1,000	27249	n.s. *	4921c	3743-7186	1,000	16350	4	n.s. *	
		<i>H.b.</i> H1-14	<i>G.m.</i>	22,1	4879c	2703-9569	0,977	27902		5257c	3501-10545	0,936	17463	4		
		<i>H.b.</i> H1-14	<i>M.m.</i>	5,9	757bc	222-4662	6,296	4328		971b	561-3639	5,067	3227	3		
		<i>S.g.</i> NC	<i>G.m.</i>	9,4	398b	257-628	11,964	2278		471b	384-610	10,445	1565	4		
		<i>S.g.</i> NC	<i>M.m.</i>	7,3	33a	16-65	144,966	188		40a	28-67	124,682	131	3		
		<i>S.g.</i> S2-10	<i>G.m.</i>	20,1	27a	13-53	179,608	152		28a	19-54	176,556	93	4		
		<i>S.g.</i> S2-10	<i>M.m.</i>	15,9	45a	24-84	105,734	258		48a	35-77	102,435	160	3		
<i>M. melolontha</i> (L2) TS I	Standard	<i>H.b.</i> HYB	<i>G.m.</i>	5,6	n.m.				n.s. *	1259c	881-2201	1,000	4181	4	n.s. *	
		<i>H.b.</i> H1-14	<i>G.m.</i>	5,1	n.m.					440c	302-811	2,864	1460	4		
		<i>S.g.</i> NC	<i>G.m.</i>	2,4	14a	1-128	1,000	177		n.s. *	36a	24-73	34,602	121	4	n.s. **
		<i>S.g.</i> S2-10	<i>G.m.</i>	2,4	14a	1-128	1,000	177			36a	24-73	34,602	121	4	
TS I	Lehm	<i>S.g.</i> S2-10	<i>G.m.</i>	12,5	140b	29-252	0,096	1850	171b	102-551	7,343	569	3	n.s. *		
<i>T. molitor</i> TS I	Sand	<i>H.b.</i> HYB	<i>G.m.</i>	4,7	3,8a	2,7-5,2	1,000	53,1	n.s. ***	5,7b	5,0-6,5	1,000	18,8	5	s. ***	
		<i>H.b.</i> H1-14	<i>G.m.</i>		7,0ab	4,9-10,0	0,535	99,2		10,9b	9,5-12,9	0,519	36,3	5		
	Standard	<i>H.b.</i> HYB	<i>G.m.</i>		4,1a	2,8-6,0	0,917	57,9		5,9b	5,0-7,0	0,965	19,5	5	n.s. **	
		<i>H.b.</i> HYB	<i>G.m.</i>		10,9b	7,3-16,0	0,346	153,5		11,1b	9,4-13,5	0,511	36,8	5		
TS II	Sand	<i>H.b.</i> HYB	<i>G.m.</i>	4,1	6,8ab	4,2-11,1	0,554	95,9	10,9b	8,7-14,5	0,519	36,3	6	s.***		
<i>T. molitor</i> TS I	Sand	<i>S.g.</i> NC	<i>G.m.</i>	3,2	2,9a	2,0-4,0	1,000	68,0	n.s. *	5,3b	4,8-5,9	1,069	17,6	5	s. ***	
		<i>S.g.</i> NC	<i>M.m.</i>		3,3a	2,1-5,0	0,872	78,0		5,2b	4,5-6,2	1,090	17,3	4		
		<i>S.g.</i> S2-10	<i>G.m.</i>		2,3a	1,5-3,6	1,238	55,0		4,5b	3,9-5,4	1,245	15,1	4		
		<i>S.g.</i> S2-10	<i>M.m.</i>		3,1a	2,0-4,7	0,939	72,5		5,2b	4,5-6,2	1,096	17,2	4		
	Standard	<i>S.g.</i> NC	<i>G.m.</i>		2,1a	1,4-3,2	1,366	49,8		9,4b	8,2-10,9	0,603	31,2	5		
		<i>S.g.</i> NC	<i>G.m.</i>		46,1b	28,9-70,5	0,060	1093,2		44,0c	37,4-53,5	0,129	146,3	7		
TS II	Sand	<i>S.g.</i> NC	<i>G.m.</i>	2,2	2,7	2,1-3,3	1,000	5,960	n.s. *	2,5a	1,9-3,6	2,242	8,4	5	n.s. *	

Das im Biotest verwendete Bodensubstrat hatte sowohl bei *H. bacteriophora* als auch bei *S. glaseri* einen Einfluss auf die Wirksamkeit der Nematoden. Zwischen den Substraten „Standard“ und Sand war kein Unterschied erkennbar, während bei Verwendung von Lehm eine signifikante Verminderung der Wirksamkeit zu beobachten war. Bei *H. bacteriophora* wurde eine signifikante Verminderung der Wirksamkeit bei *Tenebrio*-Larven um den Faktor 2-3 festgestellt (*Melolontha*-Larven wurden nicht untersucht). Bei *S. glaseri* wurde eine Verminderung der Wirksamkeit bei *Tenebrio*-Larven um den Faktor 8-16 und bei *M. melolontha*-L2-Larven um den Faktor 5-10 ermittelt (Tab. 3.2).

Die in Tabelle 3.2 angegebenen LT_{50} -Werte beziehen sich jeweils auf die höchste verwendete Nematoden-Dosis und sind daher nur dann direkt vergleichbar, wenn die höchste Dosis gleich ist. Bei *Melolontha*-Larven sind alle Werte für *H. bacteriophora* und *S. glaseri* jeweils untereinander vergleichbar, bei *Tenebrio*-Larven sind alle Werte vergleichbar. In den meisten Fällen bedingte die höhere Wirksamkeit eines Stammes auch eine schnellere Wirkung (kleinerer LT_{50} -Wert). Die LT_{50} -Werte bei *S. glaseri* sind bis auf eine Ausnahme (*H.b.* H1-14 vermehrt in *M.m.* gegen *M.m.*-L3-Larven) für *M. melolontha*- und *Tenebrio*-Larven kleiner als bei *H. bacteriophora*. Die LT_{50} -Werte bei *M. melolontha*-L2-Larven liegen für beide Nematodenarten im Bereich von 2-6 Tagen und damit unterhalb der Werte für die L3-Larven (6-22 Tage). Für *Tenebrio*-Larven liegen die Werte im Bereich von 2-5 Tagen.

Die im Testsystem II (24-Loch-Platten, \varnothing einer Vertiefung 16 mm; vgl. Abschnitt 2.3.3) durchgeführten Versuche mit *Tenebrio*-Larven ergaben im Vergleich zu Testsystem I (Zuchtbehälter, \varnothing 41 mm; vgl. Abschnitt 2.3.2) etwa gleiche (*H. bacteriophora*) oder leicht erniedrigte (*S. glaseri*) LD_{50} -Werte (keine Signifikanz) und kleinere LT_{50} -Werte (Tab. 3.2).

Eine Probit-Analyse für alle Biotests mit *Tenebrio*-Larven war nicht sinnvoll, da die Modelldaten signifikant von den Versuchsdaten abwichen (Chi-Quadrat-Test, $\alpha < 0,001$). Die in Tab. 3.2 dargestellte Unterteilung der Biotest-Daten in einzelne Probit-Analysen entspricht der kleinstmöglichen und aus statistischer Sicht geforderten (vgl. Abschnitt 2.7.2).

Wirksamkeit in Abhängigkeit vom Larvenstadium

Die Wirksamkeit eines Nematoden-Stammes variiert nicht nur zwischen Insektenarten, sondern kann auch innerhalb einer Art beträchtlich schwanken. Neben populationsbedingten Faktoren, kann das Stadium der Insektenlarve eine Rolle für die Anfälligkeit gegenüber den Nematoden spielen. Zusätzlich zu den LD_{50} -Bestimmungen wurden daher in weiteren Versuchen die unterschiedlichen Larvenstadien bis hin zum Puppenstadium beim Feld- und Waldmaikäfer sowie dem Junikäfer auf ihre Anfälligkeit gegenüber Nematoden getestet. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.4 zusammengefasst.

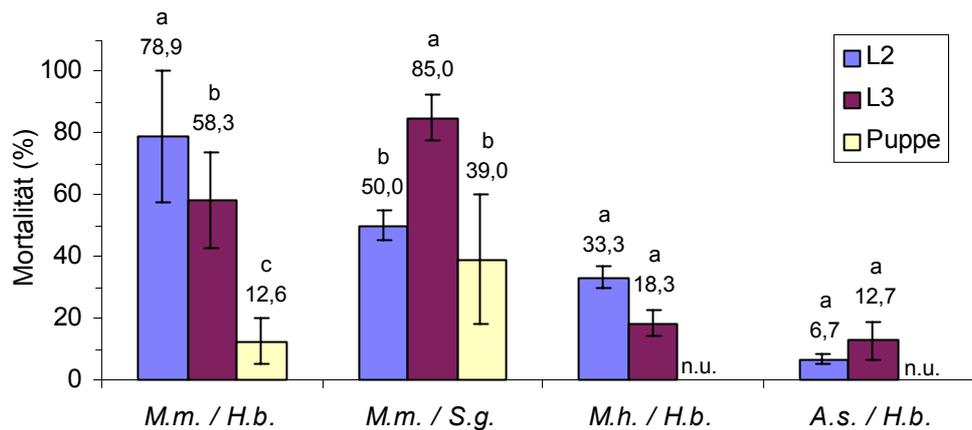


Abb. 3.4. Mortalität von L2- und L3-Larven sowie dem Puppenstadium von *M. melolontha*, *M. hippocastani* und *A. solstitialis* nach externer Applikation von 1000 Dauerlarven von *H. bacteriophora* (HYB) und *S. glaseri* (NC). Angegeben ist der Mittelwert aus 2-3 Wiederholungen. Mittleres Gewicht der Larven: *M.m.* L2: $0,473 \pm 0,037$ g (n = 20/30); *M.m.* L3: $2,000 \pm 0,109$ g (n = 20-30); *M.m.* Puppe: $1,988 \pm 0,081$ g (n = 10-35); *M.h.* L2: $0,412 \pm 0,021$ g (n = 20-30); *M.h.* L3: $1,405 \pm 0,041$ g (n = 20); *A.s.* L2: $0,124 \pm 0,004$ g (n = 30); *A.s.* L3: $0,682 \pm 0,074$ g (n = 20-30). Die Mortalitäten der einzelnen Larvenstadien einer Käferart wurden untereinander mit dem Chi-Quadrat-Test ($\alpha < 0,05$) auf Signifikanz geprüft; Werte, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind unterscheiden sich signifikant.

Die Versuche wurden bei den *M. melolontha*-Larven (L2 und L3) mit dem Ausgangsstamm (HYB) und den Selektionslinien H1-2 und H1-4 von *H. bacteriophora* durchgeführt und liegen aufgrund der höheren Wirksamkeit dieser Linien über der mittleren Wirksamkeit des Ausgangsstammes (vgl. Abb. 3.4 mit Tab. 3.1). Für *H. bacteriophora* ist die Wirksamkeit bei den L3-Larven und dem Puppenstadium signifikant geringer als bei L2-Larven, während für *S. glaseri* das L3-Stadium am anfälligsten ist. Das Puppenstadium scheint für beide Nematodenarten am wenigsten anfällig zu sein. Eine nahe liegende Erklärung hierfür ist die verminderte Penetrationsmöglichkeit für die Nematoden, da im Puppenstadium der Mund und Anus kutikulär verschlossen sind. Die Nematoden können jedoch anscheinend besser penetrieren, wenn die Puppen sich gerade zum adulten Käfer häuten. Diese Beobachtung konnte bei einer der beiden Wiederholungen gemacht werden, als ein Großteil der Puppen sich während des Versuchs häutete und dann von Nematoden befallen wurde. Die dadurch verursachte relativ hohe Mortalität des Wiederholungsversuchs, 20% im Vergleich zu 5% beim ersten Versuch bei *H. bacteriophora* und 60% im Vergleich zu 18% bei *S. glaseri*, bedingt den relativ großen Standardfehler (Abb. 3.4).

Die geringere Wirksamkeit von *S. glaseri* bei *M. melolontha*-L2-Larven scheint den Ergebnissen der LD₅₀-Bestimmungen zu widersprechen (vgl. Abb. 3.4 und Tab. 3.2). Die Ergebnisse sind jedoch nicht direkt vergleichbar, da es sich bei den hier verwendeten L2-

Larven um ein frühes bis mittleres Stadium (mittleres Gewicht: 0,473 g) und bei den für die LD₅₀-Bestimmungen verwendeten L2-Larven um ein spätes, kurz vor der Häutung stehendes Stadium (mittleres Gewicht: 0,741 g) handelte. Demnach kann der physiologische Zustand und insbesondere die Häutung der Larven deren Anfälligkeit für einen Nematodenbefall beeinflussen. Die geringere Wirksamkeit von *S. glaseri* bei L2-Larven (frühes bis mittleres Stadium) könnte dadurch bedingt sein, dass die relativ großen Dauerlarven weniger gut in die im Vergleich zu L3-Larven noch relativ kleine Mund- bzw. Anusöffnung eindringen können. Für die wesentlich kleineren Dauerlarven von *H. bacteriophora* trifft diese Einschränkung weniger zu.

Populationsbedingte Unterschiede in der Anfälligkeit gegenüber *H. bacteriophora* wurden bei vier Populationen von *M. melolontha*-L3-Larven (das mittlere Gewicht der L3-Larven lag bei allen vier Populationen zwischen 1,749 und 2,156 g) mit jeweils derselben Nematoden-Charge überprüft (Larven aus Nieder-Beerbach – 50% Mortalität, aus Horrenberg – 53%, aus Obergrombach – 43%, aus Mecklenburg-Vorpommern – 45%; n = 20-30); es konnte kein signifikanter Unterschied der Mortalitäten festgestellt werden (Chi-Quadrat-Test, $\alpha < 0,05$).

3.3.2 Infektiosität der Nematoden nach Injektion

Entomopathogene Nematoden können über Körperöffnungen (Mund, Anus, Stigmen) und zum Teil auch direkt durch die Kutikula in ein Insekt eindringen. Die Penetrationsfähigkeit des Parasiten und seine Fähigkeit, den Abwehrmechanismen des Insekts zu widerstehen, sind dabei zwei wesentliche Parameter, die eine infektiöse Nematodenart kennzeichnen. Bei den folgenden Injektionsversuchen sollte die Widerstandsfähigkeit und die Infektiosität der Nematoden untersucht werden, wenn diese sich bereits im Inneren des Insekts (Mitteldarm oder Hämocoel) befinden. Es wurden die LD₅₀- und LT₅₀-Werte (Tab. 3.4, S. 65) sowie der Anteil infizierter Engerlinge mit erfolgreicher Nematodenvermehrung ermittelt (Tab. 3.3).

Orale Injektion der Nematoden

Die Versuche zur oralen Injektion der Nematoden in *M. melolontha*-Larven (L3) sollten klären, inwieweit die Nematoden in der Lage sind, nach dem Eindringen in das Darmsystem über den Mund (oral) die Darmwand zu durchdringen und das Insekt abzutöten. Als Hauptbarrieren für die Dauerlarven können dabei die lytische Wirkung des Darmsaftes und der mechanische Widerstand der Darmwand einschließlich der peritrophischen Membran angesehen werden (vgl. Abschnitt 3.4.3). Es wurden folgende Dosierungen verwendet: *H.b.*

(HYB) – 10, 20, 50, 100, 200, 400 Nematoden pro Engerling (n = 10-20), *S.g.* (NC) – 10, 20, 50, 100 Nematoden pro Engerling (n = 15).

Hämocoelale Injektion der Nematoden

Nach dem Eindringen in das Hämocoel eines Insekts müssen die Nematoden das Immunsystem überwinden. Überlebende Nematoden geben kurze Zeit nach dem Eindringen ihre symbiotischen Bakterien in das Hämocoel ab; die Virulenz der symbiotischen Bakterien wurde daher in einem separaten Versuch ermittelt (vgl. Abschnitt 3.3.3). Die Versuche zur hämocoelalen Injektion der Nematoden sollten Aufschluss über die Infektiosität der Nematoden und deren Resistenz gegenüber dem Immunsystem der *M. melolontha*-Larven (L3) geben. Es wurden folgende Dosierungen verwendet: *H.b.* (HYB) – 1, 4, 8, 16 Nematoden pro Engerling, *S.g.* (NC) – 1, 4, 8, 16, 32, 64 Nematoden pro Engerling (n = 30).

Tab. 3.3. Anteil der abgetöteten (= infizierten) *M. melolontha*-Larven (L3) mit erfolgreicher Vermehrung der Nematoden nach oraler und hämocoelaler Injektion oberflächensterilisierter Dauerlarven von *H. bacteriophora* und *S. glaseri*. Als „infizierte“ Larven wurden tote Larven mit typischer Verfärbung (bei *H. bacteriophora* ein dunkles Rot, bei *S. glaseri* ein helles Braun) angesehen. Die Auswertung erfolgte 16-21 Tage nach der Injektion.

Nematoden-Stamm	Injektionsart	Anteil der infizierten <i>M. melolontha</i> -Larven (L3) mit erfolgreicher Vermehrung der Nematoden (%)					
Dosierung (Nematoden) →		10	20	50	100	200	400
<i>H.b.</i> HYB	oral	0	0	0	36,0	66,7	75,0
<i>S.g.</i> NC		28,6	50,0	75,0	80,0	n.u.	n.u.
Dosierung (Nematoden) →		1	4	8	16	32	64
<i>H.b.</i> HYB	hämocoelal	30,0	52,2	57,1	93,1	n.u.	n.u.
<i>S.g.</i> NC		-	0	0	50,0	50,0	85,7

Die bei den Injektionsversuchen ermittelten LD₅₀-Werte für die beiden Nematodenarten unterscheiden sich erheblich. Für *H. bacteriophora* wurde bei oraler Injektion der Nematoden eine signifikant um den Faktor 14-48 geringere Wirksamkeit als bei hämocoelaler Injektion festgestellt, während für *S. glaseri* kein Unterschied zwischen beiden Applikationsweisen bestand. Die hohe Wirksamkeit von *H. bacteriophora* bei hämocoelaler Injektion liegt im Bereich von 1-3 Nematoden pro *M. melolontha*-L3-Larve und ist damit signifikant um den Faktor 17-45 höher als bei *S. glaseri* (etwa 16-50 Nematoden pro L3-Larve). Dieses Ergebnis zeigt die hohe Effizienz des Nematoden-Bakterien-Komplexes bei *H. bacteriophora*, wenn dieser einmal im Hämocoel einer Larve angelangt ist. Die vergleichsweise geringe Wirkung bei oraler Injektion lässt den Schluss zu, dass *H. bacteriophora* Schwierigkeiten hat, die Darmwand zu penetrieren bzw. den aggressiven Bedingungen des Darmmilieus der *M.*

melolontha-Larven zu widerstehen. Für *S. glaseri* macht es dagegen keinen Unterschied, ob die Nematoden sich im Darm oder im Hämocoel befinden; die Dauerlarven scheinen weder Schwierigkeiten zu haben, die Darmwand zu penetrieren, noch der Aggressivität des Darmmilieus zu widerstehen. Ein Vergleich der LD₅₀-Werte bei Injektion (Tab. 3.4) mit den Werten bei externer Applikation der Nematoden (Tab. 3.2) zeigt, dass sich bei *S. glaseri* die Wertebereiche teilweise überschneiden: bei Injektion etwa 16-50 Nematoden und bei externer Applikation etwa 16-80 Nematoden pro L3-Larve. Bei *H. bacteriophora* ist eine große Differenz zwischen beiden bzw. den drei Wertebereichen zu beobachten: bei oraler Injektion etwa 50-144 Nematoden, bei hämocoaler Injektion etwa 1-3 Nematoden und bei externer Applikation etwa 2800-8000 Nematoden pro L3-Larve. Diese großen Unterschiede bestätigen, dass *H. bacteriophora*, unabhängig von der Art der Penetration, große Schwierigkeiten hat, in das Hämocoel einer *M. melolontha*-L3-Larve zu gelangen. Bei *S. glaseri* dagegen ist die Effizienz eines einzelnen Nematoden im Hämocoel zwar bedeutend geringer als bei *H. bacteriophora*, dafür können die Nematoden ohne Schwierigkeiten in der notwendigen Zahl (= Zahl die nötig ist um die Larve zu töten) penetrieren.

Der Anteil abgetöteter (= infizierter) L3-Larven mit erfolgreicher Nematodenvermehrung (Tab. 3.3) war bei *H. bacteriophora* bei hämocoaler Injektion der Nematoden deutlich höher als bei *S. glaseri*, während bei oraler Injektion die Verhältnisse genau umgekehrt waren. Bei hämocoaler Injektion eines einzigen Nematoden war bei *H. bacteriophora* bereits in 30% der abgetöteten L3-Larven eine erfolgreiche Vermehrung zu beobachten, d.h. in diesen Fällen wurde die Larve durch den Nematoden-Bakterien-Komplex nicht nur abgetötet, sondern der Nematode überlebte und entwickelte sich auch erfolgreich. Bei *S. glaseri* kam es erst nach hämocoaler Injektion von 16 oder mehr Nematoden in 50% oder mehr der abgetöteten L3-Larven zu einer erfolgreichen Vermehrung. Bei der oralen Injektion von 10 Nematoden kam es bei *S. glaseri* bereits in etwa 28% der abgetöteten Larven zu einer erfolgreichen Vermehrung, während dies bei *H. bacteriophora* erst nach Injektion von 100 Nematoden in etwa 36% zutraf (Tab. 3.3). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass *H. bacteriophora* über das Darmsystem, im Gegensatz zu *S. glaseri*, das Hämocoel der Larve nur sehr ineffektiv erreicht.

Tab. 3.4. Vergleich der berechneten LD₅₀- und LD₉₀-Werte bei Injektion der Nematoden (oral und hämocoel) (Abschnitt 3.3.2). Die Berechnungen wurden mit dem Programm Probitpc, Version 2.0, von Dr. Arne Peters durchgeführt. Weichen die Versuchsdaten nicht signifikant (n.s.) von den Modellwerten ab, ist das zugrundeliegende Modell zur Beschreibung der Daten geeignet; bei signifikanter Abweichung (s.) ist das Modell nicht geeignet (χ^2 , * = $\alpha < 0,05$, ** = $\alpha < 0,01$, *** = $\alpha < 0,001$). LD₅₀-Werte, die mit mindestens einem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Chi-Quadrat-Test, $\alpha < 0,05$). Die Signifikanzprüfungen wurden nur innerhalb einer Rubrik mit gemeinsamen Referenzwert (relative Wirkung = 1,000) durchgeführt. LS = Larvenstadium; FG = Freiheitsgrad; DL = Dauerlarven.

Insektenart (LS)	Nematoden-Stamm	Injektion	Probit-Analyse					Analyse nach Peto (1953)						
			LT ₅₀ [d]	LD ₅₀ [DL]	LD ₅₀ 95% KI	rel. Wirk.	LD ₉₀ [DL]	χ^2	LD ₅₀ [DL]	LD ₅₀ 95% KI	rel. Wirk.	LD ₉₀ [DL]	FG	χ^2
<i>M. melolontha</i> (L3)	<i>H.b.</i> HYB	hämocoel	2,3	1,6a	1,0-2,6	1,000	7,4	n.s.	2,1a	1,7-2,9	1,000	7,0	3	n.s.
		oral	3,0	79,4b	49,4-138,8	0,021	363,0		95,9b	71,9-144,1	0,072	318,6	5	
	<i>S.g.</i> NC	hämocoel	0,9	27,5bc	16,3-50,9	0,059	125,6	*	29,4c	21,1-48,0	0,022	97,5	5	*
		oral	3,8	25,3c	14,4-48,2	0,064	115,9		26,5c	18,1-49,2	0,080	88,0	3	

Tab. 3.5. Vergleich der berechneten LD₅₀- und LD₉₀-Werte bei hämocoelaler Injektion der symbiotischen Bakterien (Abschnitt 3.3.3). Die Berechnungen wurden mit dem Programm Probitpc, Version 2.0, von Dr. Arne Peters durchgeführt. Weichen die Versuchsdaten nicht signifikant (n.s.) von den Modellwerten ab, ist das zugrundeliegende Modell zur Beschreibung der Daten geeignet; bei signifikanter Abweichung (s.) ist das Modell nicht geeignet (χ^2 , * = $\alpha < 0,05$, ** = $\alpha < 0,01$, *** = $\alpha < 0,001$). LD₅₀-Werte, die mit mindestens einem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Chi-Quadrat-Test, $\alpha < 0,05$). Die Signifikanzprüfungen wurden nur innerhalb einer Rubrik mit gemeinsamen Referenzwert (relative Wirkung = 1,000) durchgeführt. *P.l.* = *Photorhabdus luminescens*; *X.p.* = *Xenorhabdus poinarii*; LS = Larvenstadium; FG = Freiheitsgrad; BZ = Bakterienzellen.

Insektenart (LS)	Bakterium	LS	Probit-Analyse					Analyse nach Peto (1953)						
			LT ₅₀ [d]	LD ₅₀ [BZ]	LD ₅₀ 95% KI	rel. Wirk.	LD ₉₀ [BZ]	χ^2	LD ₅₀ [BZ]	LD ₅₀ 95% KI	rel. Wirk.	LD ₉₀ [BZ]	FG	χ^2
<i>M. melolontha</i> (L2 und L3)	<i>P.l.</i> (aus <i>H.b.</i> HYB)	L3	1,4	241b	111-523	1,000	3195	n.s.	329b	246-494	1,000	1091	3	s. ***
		L2	2,6	18a	6-67	13,201	242	*	31a	21-58	10,691	102	3	n.s. *
	<i>X.p.</i> (aus <i>S.g.</i> NC)	L3	0,2	7848	5862-10982	1,000	42684	s. ***	8337c	6575-11389	0,039	27695	8	s. ***

3.3.3 Hämocoale Injektion der symbiotischen Bakterien

Entomopathogene Nematoden entlassen ihre symbiotischen Bakterien nach dem Eindringen in das Hämocoel eines Insekts. Die Bakterien tragen, je nach Nematodenart, wesentlich zum Absterben des Insekts bei. Zur Ermittlung der Virulenz der symbiotischen Bakterien von *H. bacteriophora* und *S. glaseri* wurden diese in das Hämocoel von *M. melolontha*-Larven (L2 und L3) injiziert. Die Injektionsversuche sollten helfen, den Beitrag der Bakterien an der Infektiosität des Nematoden-Bakterien-Komplexes gegenüber den *M. melolontha*-Larven abzuschätzen.

Die LD₅₀-Bestimmungen bei hämocoaler Injektion der symbiotischen Bakterien ergaben ähnliche Verhältnisse wie bei der hämocoalen Injektion der Nematoden (Tab. 3.5, S. 65). Für *Photorhabdus luminescens*, dem symbiotischem Bakterium von *H. bacteriophora*, wurde ein LD₅₀-Wert von etwa 110-490 Bakterien pro *M. melolontha*-L3-Larve und ein signifikant geringerer Wert von 6-58 Bakterien pro L2-Larve ermittelt. Für *Xenorhabdus poinarii*, dem symbiotischen Bakterium von *S. glaseri*, lag der Wert bedeutend höher, etwa zwischen 6000-11000 Bakterien pro L3-Larve. Für L2-Larven dürfte sich ein ähnliches Bild ergeben, eine exakte Bestimmung erfolgte jedoch nicht (nach Injektion von 1000 Bakterienzellen war die Mortalität etwa 10%, Daten nicht dargestellt).

Die hohe Effizienz des Nematoden-Bakterien-Komplexes bei hämocoaler Injektion von *H. bacteriophora* lässt sich also in erster Linie der hohen Virulenz der symbiotischen Bakterien zuschreiben. *S. glaseri* kann demnach die gleiche Wirkung nur durch eine erhöhte Penetrationsrate erreichen. Dieser Aspekt wurde in den folgenden Untersuchungen berücksichtigt.

3.4 Infektionsbiologie II – Infektionsverhalten und Penetrationsroute

3.4.1 Wanderaktivität, Wirtsfindung und -präferenz der Nematoden

Voraussetzung für die erfolgreiche Infektion eines Insekts durch Nematoden ist zunächst, dass ein potentieller Wirt wahrgenommen und aufgesucht wird. Zur Prüfung der Wanderaktivität (Mobilität), der Wirtsfindung und -präferenz der Nematoden wurden Versuche auf Agaroseplatten und in Sandröhren durchgeführt.

Wanderaktivität auf Agaroseplatten

Die Versuche zur Wanderaktivität (Mobilität) der Nematoden auf Agaroseplatten dienten lediglich dazu, einen Vergleich für die Verteilungsgeschwindigkeit der beiden Nematodenarten zu erhalten. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.5 dargestellt.

Die Art *S. glaseri* hatte bei allen untersuchten Zeitpunkten eine signifikant höhere Verteilungsgeschwindigkeit als *H. bacteriophora*. Nach sechs min ist bei *S. glaseri* bereits ein leichtes Abflachen des Kurvenverlaufs zu erkennen, d.h. ein Großteil der Nematoden hat sich bis zu diesem Zeitpunkt bereits über die Platte verteilt. Im Gegensatz hierzu steigt die Kurve bei *H. bacteriophora* auch nach diesem Zeitpunkt noch stärker an. Die Art *S. glaseri* hat demnach eine deutlich höhere Grundaktivität, d.h. eine Wanderaktivität („Wanderbereitschaft“, Mobilität) ohne Veranlassung durch eine äußere Reizquelle (z.B. ein Insekt). Die Versuche lassen Rückschlüsse auf die Verteilungsgeschwindigkeit und bedingt auch auf den Verteilungsgrad der Nematoden im Substrat zu. Der Verteilungsgrad entspricht dem Produkt aus der Anzahl wandernder Nematoden und der jeweils zurückgelegten Strecke.

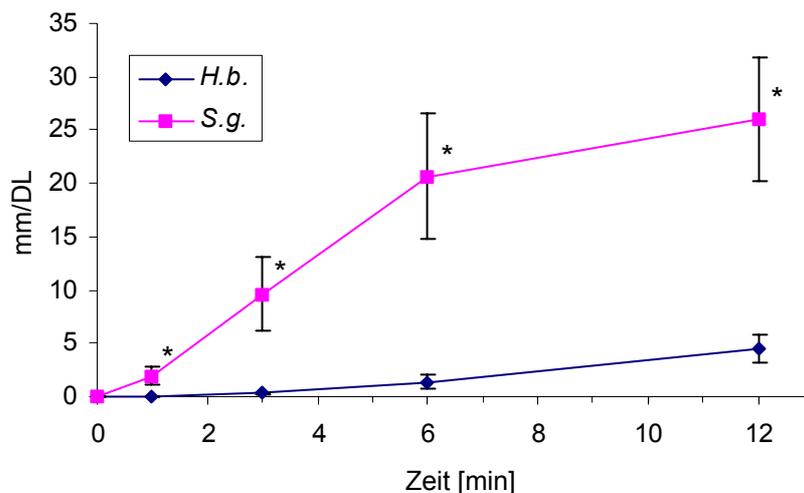


Abb. 3.5. Mobilität der Dauerlarven von *H. bacteriophora* und *S. glaseri* auf Agaroseplatten. Gezeigt ist der Mittelwert (pro Dauerlarve zurückgelegte Strecke in mm) aus acht (*H.b.*) bzw. sechs (*S.g.*) Chargen, wobei für jede Charge sieben Parallelen gemessen wurden. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) durchgeführt. Die mit * gekennzeichneten Werte eines Zeitpunktes unterscheiden sich signifikant voneinander (Mann-Whitney-U-Test, $\alpha < 0,05$). DL = Dauerlarve.

Wanderaktivität, Wirtsfindung und –präferenz in Sandröhren

Bei den Versuchen in Sandröhren (Abb. 2.1), wurde die Verteilung der Nematoden bei An- und Abwesenheit eines Insekts verglichen. Um eine etwaige Wirtspräferenz zu überprüfen, wurde den Nematoden in einem weiteren Versuch an den Enden der Sandröhre jeweils verschiedene Insektenlarven (*M. melolontha*- versus *Tenebrio*-Larven) angeboten. Neben der

Verteilung der Nematoden im Sand, wurden auch bereits in die Insektenlarven eingedrungene Nematoden erfasst. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.6 dargestellt.

Aus den Daten lässt sich ableiten, dass *S. glaseri* im Vergleich zu *H. bacteriophora* sowohl bei An- als auch bei Abwesenheit einer Insektenlarve aktiver wandert. Die Verteilung der Nematoden ohne Anwesenheit eines Insekts entspricht bei *S. glaseri* einer Normalverteilung. Bei *H. bacteriophora* trifft dies aufgrund des hohen Anteils der Nematoden, die am Applikationsort verharren, nicht zu. Beide Nematodenarten zeigten eine deutliche Akkumulation in dem Abschnitt der eine *M. melolontha*-Larve (L3) enthielt. Die Nematoden erkannten offenbar die Anwesenheit dieses potentiellen Wirts und verblieben in dessen Nähe. Bei Angebot von *Tenebrio*-Larven traf dies nur für *S. glaseri* zu, während *H. bacteriophora* auf *Tenebrio*-Larven kaum reagierte. Bei alleinigem Angebot von *Tenebrio*-Larven entsprach die Verteilung bei *H. bacteriophora* der ohne Angebot eines Insekts, d.h. ein Großteil der Nematoden verharrte am Applikationsort. Wurden *Tenebrio*-Larven und *M. melolontha*-Larven gleichzeitig angeboten, verteilte sich *S. glaseri* gleichmäßig auf die beiden Abschnitte mit den potentiellen Wirten, während *H. bacteriophora* bei beiden Auswahlversuchen (8 bzw. 16 *Tenebrio*-Larven versus eine *M. melolontha*-Larve) das gleiche Verteilungsmuster wie bei alleinigem Angebot einer *M. melolontha*-Larve zeigte. Bei *S. glaseri* scheint in der Wirtsfindung und -erkennung zwischen den beiden Insektenarten kein Unterschied zu bestehen. Bei *H. bacteriophora* besteht im Vergleich der Mittelwerte der Anzahl Nematoden in den Abschnitten mit *Tenebrio*-Larven versus der Abschnitte mit *M. melolontha*-Larven ein signifikanter Unterschied (t -Test, $\alpha < 0,05$), woraus sich in Bezug auf die Wirtsfindung und -erkennung eine Präferenz der Nematoden für *M. melolontha*-Larven ableiten lässt.

Bei Angebot von 16 *Tenebrio*-Larven waren bei *S. glaseri* signifikant mehr Nematoden in dem entsprechenden Abschnitt zu finden als in dem Abschnitt mit der *M. melolontha*-Larve (59,2 im Vergleich zu 21,4%; t -Test, $\alpha < 0,05$), d.h. eine höhere Wirtsdichte zog mehr Nematoden an. Für beide Nematodenarten war der Anteil penetrierter Nematoden bei Angebot von 16 *Tenebrio*-Larven (*H.b.* - 87,0 bzw. *S.g.* - 81,8%) signifikant höher als bei Angebot von acht Larven (61,1 bzw. 59,9%; t -Test, $\alpha < 0,05$). Der Anteil in das Insekt penetrierter Nematoden war für *Tenebrio*-Larven mit $69,0 \pm 9\%$ bei *H. bacteriophora* und mit $74,2 \pm 7,2\%$ bei *S. glaseri* etwa gleich groß. Bei den *M. melolontha*-Larven lag er für *H. bacteriophora* bei $1,6 \pm 0,1\%$ und damit signifikant unter dem von *S. glaseri* mit $2,4 \pm 0,2\%$ (Tukey-Test, $\alpha < 0,05$). Die Werte beider Nematodenarten für die *M. melolontha*-Larven unterscheiden sich signifikant von den Werten der *Tenebrio*-Larven (Tukey-Test, $\alpha < 0,05$); die unterschiedliche Anfälligkeit der beiden Insektenarten korreliert also mit der Penetrationsfähigkeit der Nematoden.

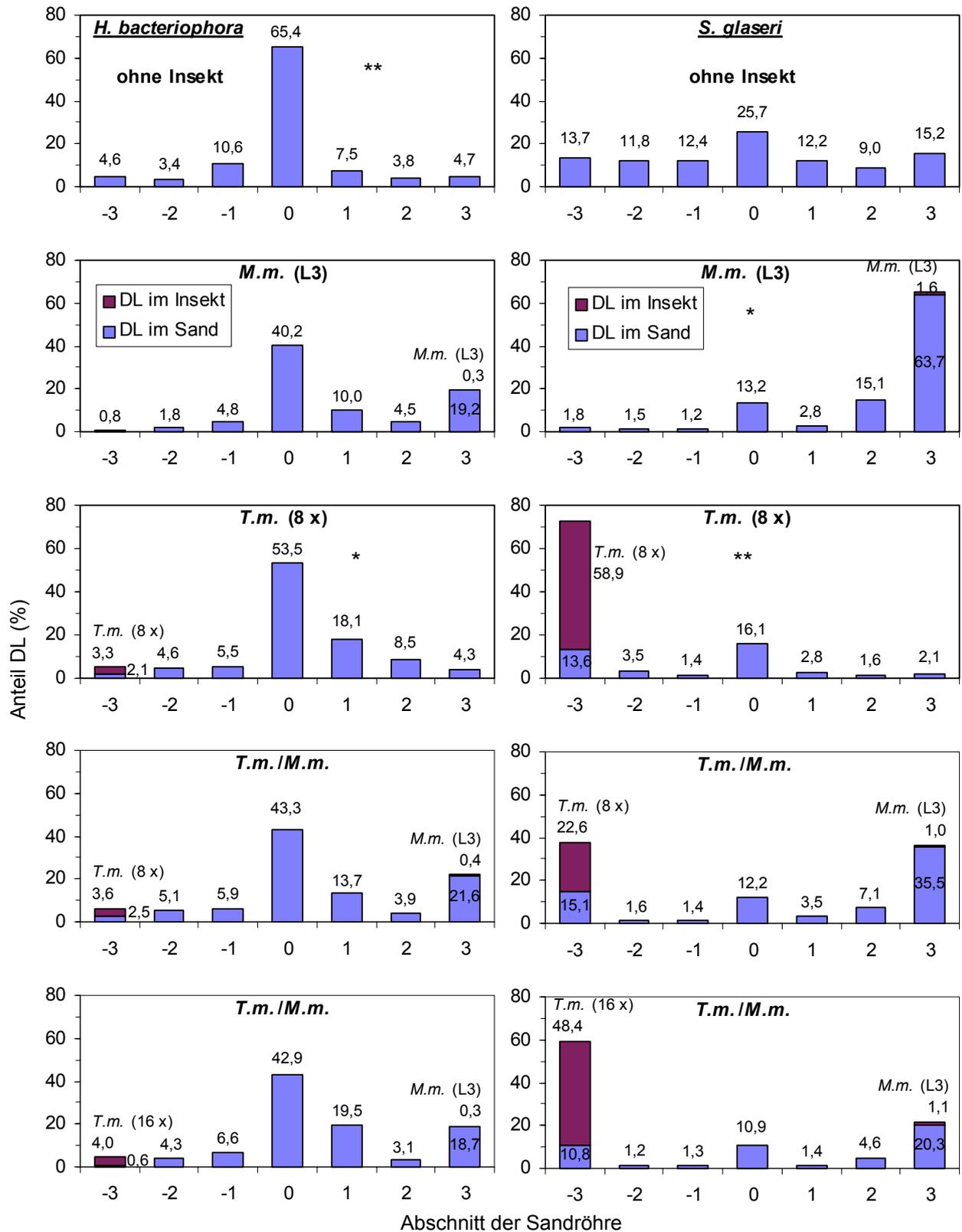


Abb. 3.6. Wanderaktivität, Wirtsfindung und –präferenz von *H. bacteriophora* und *S. glaseri* in Sandröhren. Im letzten Abschnitt der Sandröhre (vgl. Abb. 2.1) wurde entweder kein Insekt, eine *M. melolontha*-Larve (L3) oder 8 (16) *Tenebrio*-Larven angeboten. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Wiederholungen. Die Standardfehler sind zur Erleichterung der Übersicht nicht dargestellt. Die Verteilung der Nematoden in den mit * gekennzeichneten Diagrammen unterscheidet sich signifikant von einer Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test, * = $\alpha < 0,05$, ** = $\alpha < 0,01$). DL = Dauerlarven.

3.4.2 Infektionsdynamik und Penetrationsroute bei externer Applikation

Die Untersuchung der Infektionsdynamik sollte Aufschluss darüber geben, wie schnell, in welchem Umfang und an welchen Stellen die Nematoden unter den gegebenen Bedingungen in *M. melolontha*-Larven eindringen. Die Versuche wurden mit L2- und L3-Larven durchgeführt. Dabei wurden die Larven unterschiedlich lang einer definierten Nematodenpopulation ausgesetzt und danach entnommen und seziiert. Ermittelt wurde die Zahl der eingedrungenen Nematoden und deren Aufenthaltsort in der Larve, differenziert nach Mitteldarm, Enddarm und Hämocoel. Zusätzlich wurde den Larven Hämolymphe entnommen und auf das Vorkommen der symbiotischen Bakterien der Nematoden hin untersucht.

Aus den Abb. 3.7-3.9 ist ersichtlich, dass die Geschwindigkeit der Penetration innerhalb der ersten 24 h nach Applikation der Dauerlarven bei *H. bacteriophora* und *S. glaseri* etwa gleich groß bzw. für *H. bacteriophora* etwas größer ist. Danach nimmt die Penetrationsrate (β = Anzahl penetrierender Dauerlarven pro Zeiteinheit) für *S. glaseri* meist exponentiell zu, während sie bei *H. bacteriophora* auf niedrigem Niveau bleibt. Entsprechend ist die Penetrationsrate sowie der Anteil der penetrierenden Dauerlarven (= α) in Bezug auf die gesamte Dauerlarvenpopulation (= Zahl der applizierten Dauerlarven) bei *H. bacteriophora* in den meisten Fällen deutlich kleiner (Tab. 3.6).

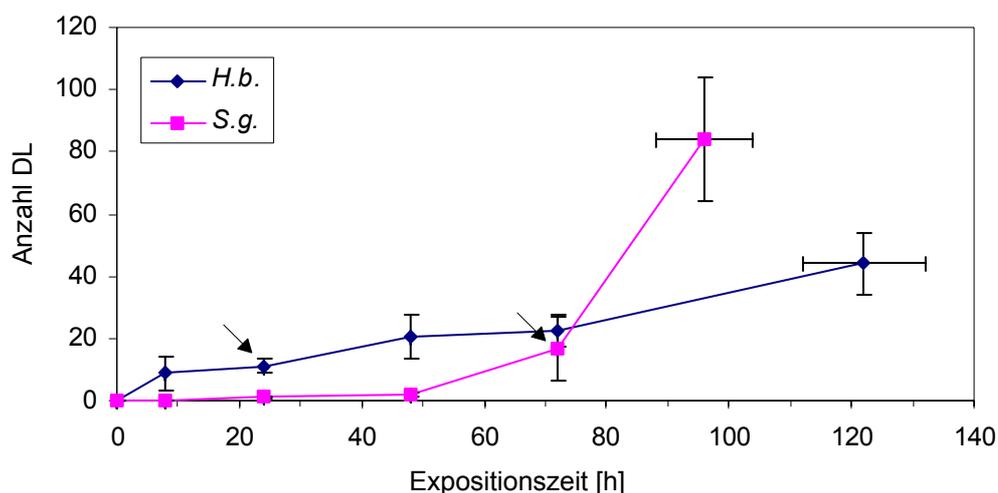


Abb. 3.7. Durchschnittliche Anzahl und Standardfehler der in *M. melolontha* Larven (L2) eingedrungenen Dauerlarven von *H. bacteriophora* und *S. glaseri* nach externer Applikation von 1000 Dauerlarven und unterschiedlich langer Exposition im **Testsystem II**. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt des erstmaligen Nachweises der jeweiligen symbiotischen Bakterien in der Hämolymphe der L2-Larven. Der letzte Datenpunkt wurde bei Larven ermittelt, die maximal 24 h tot waren. Mittleres Gewicht der *M.m.*-L2 Larven: $0,550 \pm 0,015$ g.

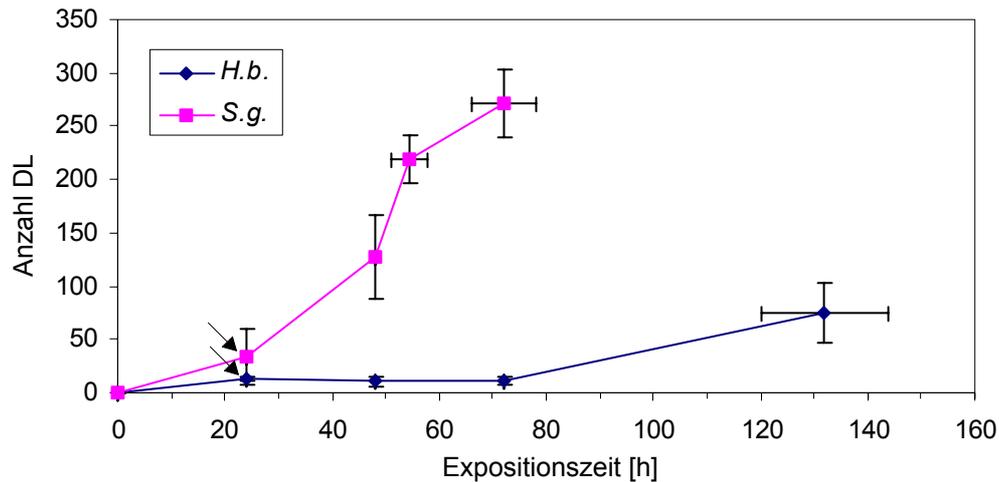


Abb. 3.8. Durchschnittliche Anzahl und Standardfehler der in *M. melolontha* Larven (L2) eingedrungenen Dauerlarven von *H. bacteriophora* und *S. glaseri* nach externer Applikation von 1000 Dauerlarven und unterschiedlich langer Exposition im **Testsystem I**. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt des erstmaligen Nachweises der jeweiligen symbiotischen Bakterien in der Hämolymphe der L2-Larven. Die L2-Larven standen kurz vor der Häutung zum L3-Stadium. Der letzte Datenpunkt wurde bei Larven ermittelt, die maximal 24 h tot waren. Mittleres Gewicht der *M.m.*-L2 Larven: $0,741 \pm 0,035$ g.

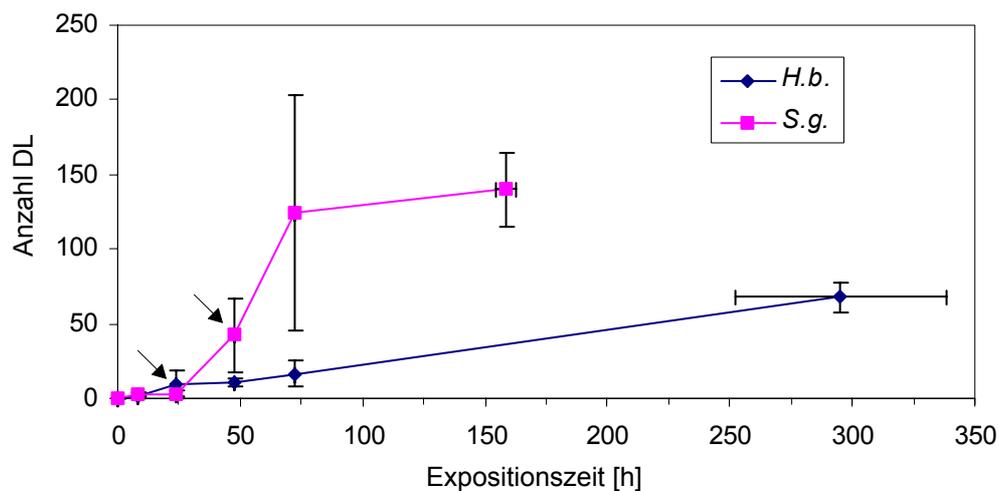


Abb. 3.9. Durchschnittliche Anzahl und Standardfehler der in *M. melolontha* -Larven (L3) eingedrungenen Dauerlarven nach externer Applikation von 8000 Dauerlarven von *H. bacteriophora* bzw. 1000 Dauerlarven von *S. glaseri* und unterschiedlich langer Exposition im **Testsystem I**. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt des erstmaligen Nachweises der jeweiligen symbiotischen Bakterien in der Hämolymphe der L3-Larven. Der letzte Datenpunkt wurde bei Larven ermittelt, die maximal 24 h tot waren. Mittleres Gewicht der *M.m.*-Larven (L3): $1,679 \pm 0,071$ g.

Aufgrund der großen Schwankungen unterscheiden sich die α -Werte nur in einigen Fällen signifikant (Tab. 3.6), bei den *Tenebrio*-Larven sind die Werte jedoch tendenziell größer als bei den *M. melolontha*-Larven. Ähnliches gilt für die Penetrationsrate β . Auffallend sind die relativ hohen Werte von α und β bei den *M.m.*-L2-Larven im Testsystem I (Abb. 3.7; Tab. 3.6). Ursache für diese hohen Werte könnte der Umstand gewesen sein, dass die Larven kurz

vor der Häutung zum L3-Stadium standen und ein Teil der Larven sich noch während des Versuches häutete. Dies war bei den L2-Larven, die im in Abb. 3.7 dargestellten Versuch verwendet wurden, nicht so.

Die Parameter wurden mit SigmaStat über nicht-lineare Regressionsanalysen ermittelt. Sie ermöglichen sowohl für das Modell von Anderson (1978a,b) als auch für das Modell von Bohan & Hominick (1995) in den meisten Fällen eine gute bis sehr gute Beschreibung der gefundenen Daten (Tab. 3.6).

Tab. 3.6. Berechnung der Parameter für die Infektions-Modelle nach Bohan & Hominick (1995) und nach Anderson (1978a,b) mit dem Statistik-Programm SigmaStat (Version 2.03). Der Parameter α (= Anteil infektiöser Nematoden) wurde Modell-unabhängig bei Larven, die maximal 24 h tot waren, ermittelt. Werte, die mit mindestens einem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Kruskal-Wallis-Test, Methode nach Dunn, $\alpha < 0,05$). β = Penetrationsrate pro Zeiteinheit; LS = Larvenstadium; n.u. = nicht untersucht.

Nematodenstamm	Insektenart (LS)	Testsystem	$\alpha \pm \text{SE} (\%)$	$\beta [\text{Nematoden/h}] \times 10^{-2} \pm \text{SE}$	
				Bohan & Hominick (1995)	Anderson (1978a,b)
<i>H.b.</i> HYB	<i>M.m.</i> (L2) ²	I	7,47 ± 2,75ab	0,99 ± 0,62**	n.m.
	<i>M.m.</i> (L2) ³	II	4,42 ± 0,52ab	1,62 ± 0,19****	1,15 ± 0,14****
	<i>M.m.</i> (L3) ⁴	I	0,84 ± 0,12a	0,82 ± 0,32***	0,60 ± 0,12****
	<i>T.m.</i>	I	11,00 ± 2,92ab	n.u.	n.u.
	<i>T.m.</i>	II	11,46 ± 1,63ab	1,03 ± 0,63**	n.m.
<i>S.g.</i> NC	<i>M.m.</i> (L2) ²	I	27,10 ± 3,21b	3,14 ± 1,67*	n.m.
	<i>M.m.</i> (L2) ³	II	8,40 ± 1,07ab	0,21 ± 0,07**	0,20 ± 0,07**
	<i>M.m.</i> (L3) ⁴	I	13,98 ± 2,43b	1,92 ± 0,10***	1,35 ± 0,43***
	<i>T.m.</i>	I	9,81 ± 3,48ab	n.u.	n.u.
	<i>T.m.</i>	II	29,70 ± 3,72b	7,03 ± 5,68**	79,80*

¹ n.m. = nicht mögl. ($R_{adj}^2 = 0$); * $R_{adj}^2 = 0,41-0,50$; ** $R_{adj}^2 = 0,51-0,70$; *** $R_{adj}^2 = 0,71-0,90$; **** $R_{adj}^2 > 0,90$

^{2,3,4} Gewicht der Larven: ² L2: 0,741 ± 0,035 g; ³ L2: 0,550 ± 0,015 g; ⁴ L3: 1,679 ± 0,071 g

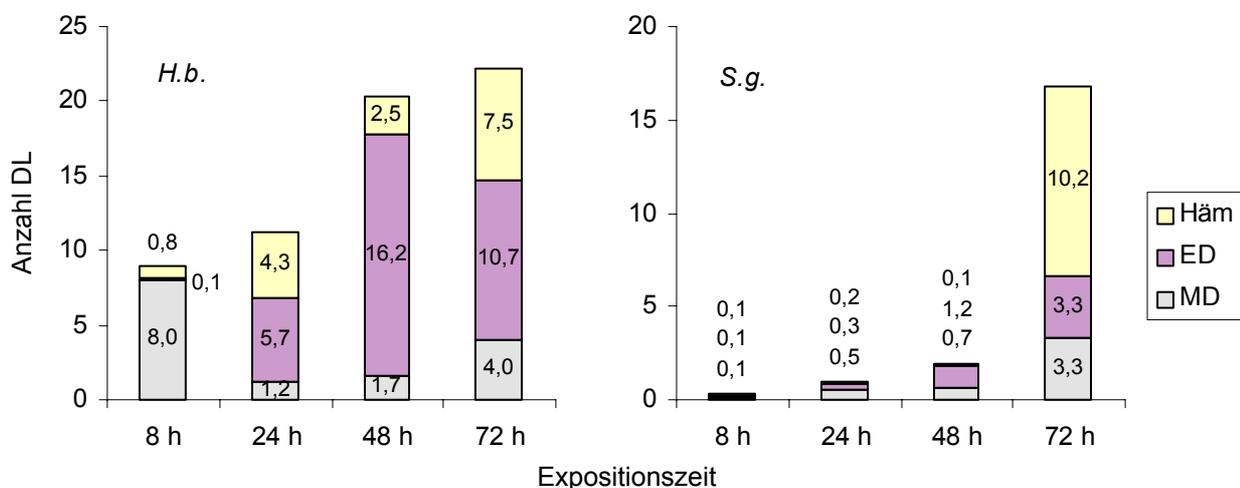


Abb. 3.10. Durchschnittliche Anzahl und Aufenthaltsort der in *M. melolontha*-Larven (L2) eingedrungenen Dauerlarven von *H. bacteriophora* und *S. glaseri* bei externer Applikation von 1000 Dauerlarven und nach unterschiedlich langer Exposition im Testsystem II. MD = Mitteldarm; ED = Enddarm; Häm = Hämolymphe. Mittleres Gewicht der *M.m.*-L2 Larven: 0,550 ± 0,015 g.

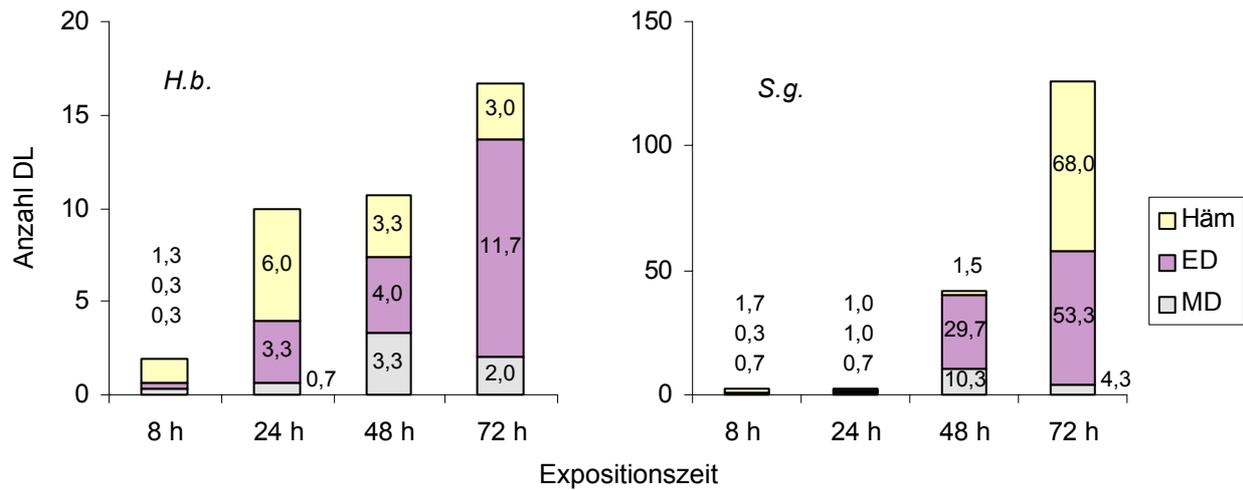


Abb. 3.11. Durchschnittliche Anzahl und Aufenthaltsort der in *M. melolontha*-Larven (L3) eingedrungenen Dauerlarven nach externer Applikation von 8000 Dauerlarven von *H. bacteriophora* bzw. 1000 Dauerlarven von *S. glaseri* nach unterschiedlich langer Exposition im **Testsystem I**. MD = Mitteldarm; ED = Enddarm; Häm = Hämolymphe. Mittleres Gewicht der *M.m.*-Larven (L3): $1,679 \pm 0,071$ g. Man beachte die unterschiedliche Skalierung der Achsen.

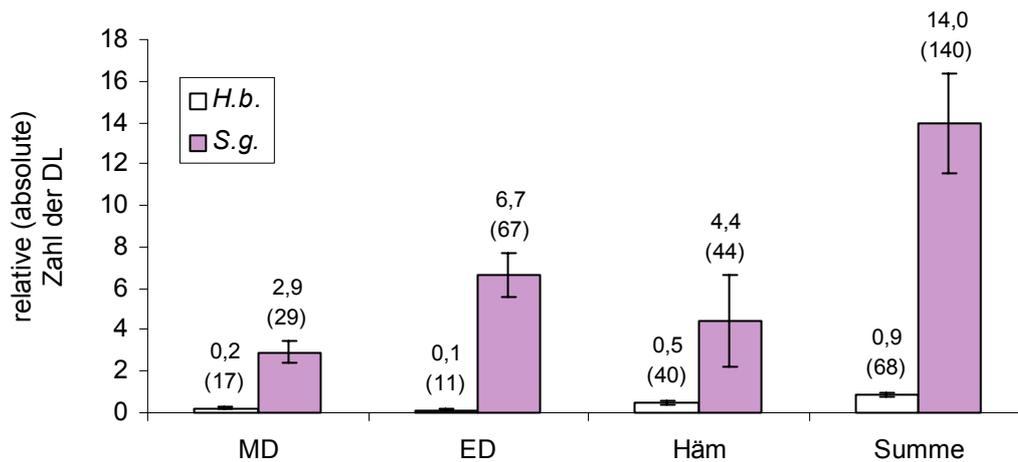


Abb. 3.12. Relative (%) und in Klammern die absolute Zahl penetrierter Dauerlarven von *H. bacteriophora* und *S. glaseri* und deren Aufenthaltsort in frisch verendeten *M. melolontha*-Larven (L3) nach externer Applikation von 8000 Dauerlarven bei *H. bacteriophora* und 1000 bei *S. glaseri*. MD = Mitteldarm; ED = Enddarm; Häm = Hämolymphe. Mittleres Gewicht der *M.m.*-Larven (L3): $1,679 \pm 0,071$ g.

Bezüglich der Penetrationsroute können keine eindeutigen Aussagen getroffen werden, es deuten sich jedoch Tendenzen an. Die Dauerlarven beider Nematodenarten dringen offensichtlich regelmäßig über den Enddarm in *M. melolontha*-Larven ein (Abb. 3.10-3.12). Bei *S. glaseri* scheint diese Route besonders bei den L3-Larven die bevorzugte zu sein (Abb. 3.11 und 3.12). Bei *H. bacteriophora* war sie besonders bei den L2-Larven zu beobachten (Abb. 3.10).

Bei *H. bacteriophora* fällt auf, dass relativ schnell nach der Applikation einige Dauerlarven direkt in der Hämolymphe nachweisbar waren (Abb. 3.10 und 3.11). Auch die symbiotischen Bakterien waren meist früher nachweisbar als bei *S. glaseri* (Abb. 3.7-3.9). Bei *S. glaseri* waren in der Hämolymphe erst später anteilmäßig mehr Dauerlarven zu beobachten (Abb. 3.10 und 3.11).

Die Mortalität der *M. melolontha*-Larven fällt den Werten α und β entsprechend nach den verschiedenen Expositionszeiten unterschiedlich hoch aus (Daten nicht dargestellt). Eine Expositionszeit von weniger als 24 h führte in keinem Fall zu einer erfolgreichen Infektion einer Larve. Wie die Auszählungen zeigten, heißt dies nicht, dass keine Dauerlarven innerhalb dieser Zeit penetrierten (vgl. Abb. 3.7-3.9, 3.10 und 3.11).

Gibt es eine phasenweise Infektiosität innerhalb der Dauerlarvenpopulation?

Die Tatsache, dass offensichtlich nur ein kleiner Teil einer Dauerlarvenpopulation in ein zur Verfügung stehendes Insekt eindringt, wirft die Frage auf, ob ein Großteil der Dauerlarven nicht in der Lage ist in ein Insekt zu penetrieren und ob dies zu einem gegebenen Zeitpunkt jeweils nur einige Dauerlarven betrifft bzw. sich der Anteil dieser Dauerlarven phasenweise (zeitweise) ändert. Die folgenden Versuche sollten dieser Frage nachgehen, indem zu einer Dauerlarvenpopulation mehrmals hintereinander einige Tage eine *M. melolontha*-Larve bzw. mehrere *Tenebrio*-Larven gegeben und danach die Anzahl penetrierter Dauerlarven bzw. die Mortalität der Insekten ermittelt wurde.

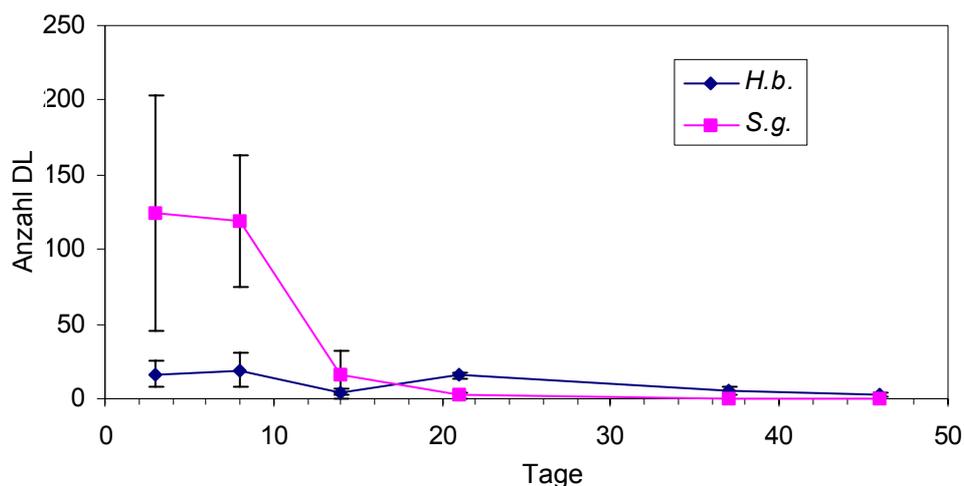


Abb. 3.13. Durchschnittliche Anzahl mit Standardfehler der pro *M. melolontha*-Larve (L3) penetrierten Dauerlarven nach verschiedenen langen Expositionszeiten in jeweils gleichen Dauerlarvenpopulationen. Jeder Datenpunkt entspricht dem Zeitpunkt des Auszählens der penetrierten Dauerlarven und dem Besatz durch neue *M. melolontha*-Larven. Bei *H. bacteriophora* wurden anfangs 8000, bei *S. glaseri* 1000 Dauerlarven appliziert. Die Versuche wurden mit dem Testsystem I durchgeführt.

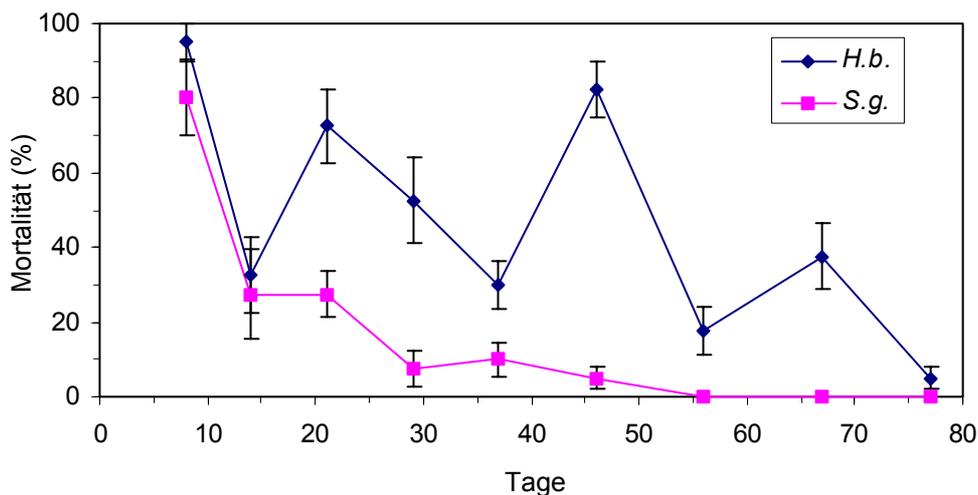


Abb. 3.14. Durchschnittliche Mortalität mit Standardfehler bei *Tenebrio*-Larven nach verschiedenen langen Expositionszeiten in jeweils gleichen Dauerlarvenpopulationen. Jeder Datenpunkt entspricht dem Zeitpunkt der Ermittlung der Mortalität und dem Besatz durch neue *Tenebrio*-Larven. Bei *H. bacteriophora* wurden anfangs 8000, bei *S. glaseri* 1000 Dauerlarven appliziert. In jeder der Dauerlarvenpopulationen wurde zu Beginn für drei Tage eine *M.m.* L3-Larve gesetzt. Die Versuche wurden mit dem Testsystem I durchgeführt (acht *Tenebrio*-Larven pro Gefäß).

Aus Abb. 3.13 geht hervor, dass bei *H. bacteriophora* die Anzahl der penetrierenden Dauerlarven deutlich kleiner als bei *S. glaseri* ist (zwischen 5 und 20, dies entspricht 0,06-0,25% der Dauerlarven), dafür aber über längere Zeit mehr oder weniger auf gleichem Niveau bleibt. Bei *S. glaseri* ist dagegen anfangs die Zahl der penetrierenden Dauerlarven relativ hoch (zwischen 100 und 150, dies entspricht etwa 10-15% der Dauerlarven) und nimmt dann relativ schnell und kontinuierlich ab (nach dem 3. Austausch nahezu null; Abb. 3.13).

Ein ähnlicher Trend ist auch anhand der Mortalitäten aus Abb. 3.14 erkennbar. Auffallend bei *H. bacteriophora* sind die enormen Schwankungen. Bei *S. glaseri* nahm die Mortalität der *Tenebrio*-Larven hingegen mit jedem Austausch kontinuierlich ab. Bei *S. glaseri* lässt sich offensichtlich auf diese Art und Weise relativ schnell die gesamte Dauerlarvenpopulation (bzw. die infektiösen Dauerlarven) ködern. Dies ist nur möglich, wenn jeweils die Zahl (der Anteil) der penetrierenden Dauerlarven relativ hoch ist. Bei *H. bacteriophora* stellt sich deshalb die Frage, warum nur ein so geringer Anteil der Dauerlarven penetriert bzw. nach den Ursachen für das Auf und Ab der Wirksamkeit (Abb. 3.14).

In einem weiteren Versuch (Daten nicht dargestellt) wurde den Dauerlarven direkt nach der Applikation für einige Tage eine *M. melolontha*-Larve bzw. *Tenebrio*-Larven zur Verfügung gestellt und dann erst wieder nach 37 Tagen. Sowohl die Zahl der penetrierten Dauerlarven als auch die Mortalität der *Tenebrio*-Larven unterschieden sich zwischen diesen beiden Zeitpunkten bei beiden Nematodenarten nur unwesentlich voneinander. Aus diesem Befund

lässt sich ableiten, dass die Abnahme der Anzahl penetrierender Dauerlarven bzw. der Wirksamkeit der Nematoden nicht primär auf das zunehmende Alter der Dauerlarven oder auf dem Absterben von Dauerlarven beruht.

Exposition des Kopfes oder des Anus

Die Exposition des Kopfes oder des Anus mit Hilfe einer speziellen Versuchsanordnung (Abb. 2.2) sollte Aufschluss darüber geben, über welche der beiden Körperöffnungen die Nematoden effektiver in *M. melolontha*-Larven (L3) eindringen und diese töten können.

Bei *H. bacteriophora* ergab sich nur ein geringer Unterschied in der Anzahl penetrierter Dauerlarven nach Exposition des Kopfes bzw. des Anus der *M. melolontha*-Larven, es penetrierten insgesamt nur sehr wenige Dauerlarven (Abb. 3.15). Dagegen penetrierten bei *S. glaseri* deutlich mehr Dauerlarven in die mit dem Anus exponierten *M. melolontha*-Larven; die meisten Dauerlarven waren im Enddarm zu finden (Abb. 3.16).

Bei Erhöhung der Dosis war bei *H. bacteriophora* ab 2000 applizierten Nematoden ein deutlicher und bei 4000 Nematoden pro *M. melolontha*-Larve ein signifikanter Unterschied in der Mortalität zwischen den mit dem Kopf bzw. Anus exponierten Larven nachweisbar (Abb. 3.17). Im Gegensatz hierzu bestand bei *S. glaseri* für keine der getesteten Dosierungen ein signifikanter Unterschied (Abb. 3.18).

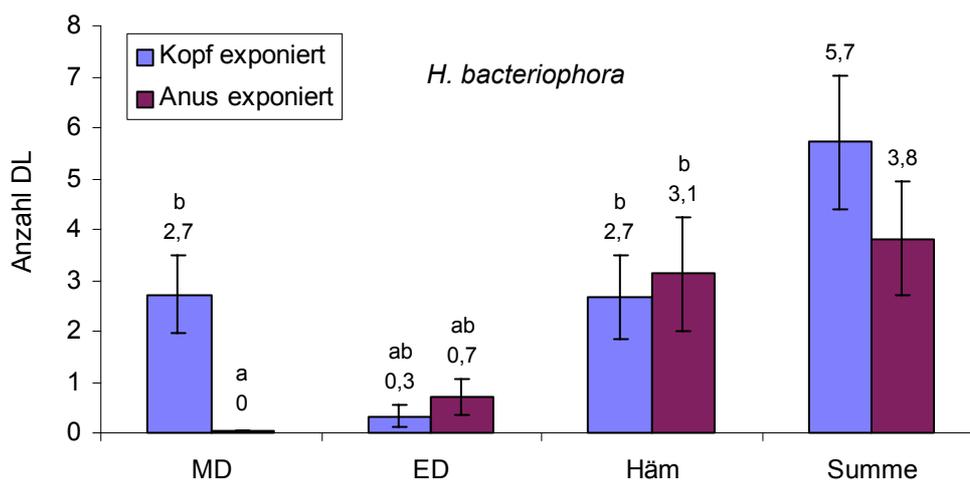


Abb. 3.15. Zahl und Aufenthaltsort der in *M. melolontha*-Larven (L3) eingedrungenen Dauerlarven von *H. bacteriophora* nach 24 h Exposition des Kopfes oder des Anus bei 1000 applizierten Dauerlarven. Werte, die mit mindestens einem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Kruskal-Wallis-Test, Methode nach Dunn, $\alpha < 0,05$). Die beiden Summenwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (t -Test, $\alpha < 0,05$). MD = Mitteldarm; ED = Enddarm; Häm = Hämolymphe.

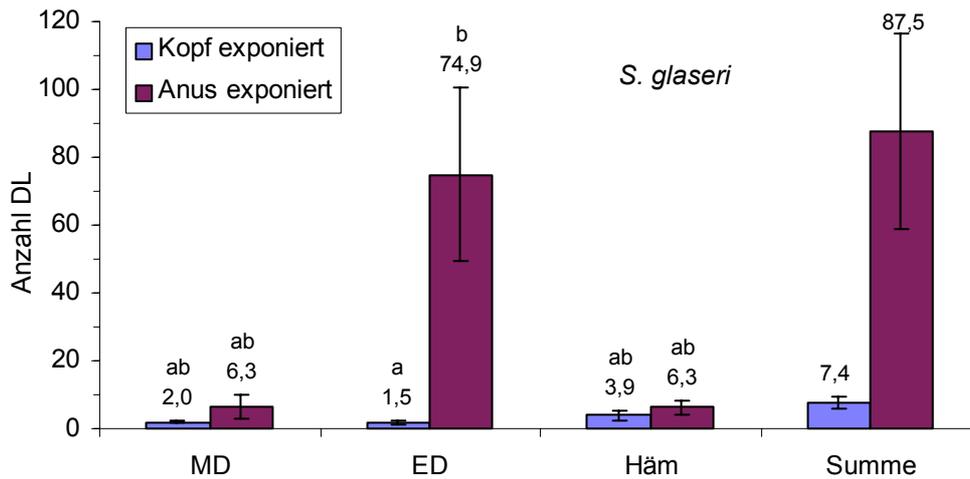


Abb. 3.16. Zahl und Aufenthaltsort der in *M. melolontha*-Larven (L3) eingedrungenen Dauerlarven von *S. glaseri* nach 24 h Exposition des Kopfes oder des Anus bei 1000 applizierten Dauerlarven. Werte, die mit mindestens einem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Kruskal-Wallis-Test, Methode nach Dunn, $\alpha < 0,05$). Die beiden Summenwerte unterscheiden sich signifikant voneinander (Wilcoxon-Test, $\alpha < 0,05$). MD = Mitteldarm; ED = Enddarm; Häm = Hämolymphe.

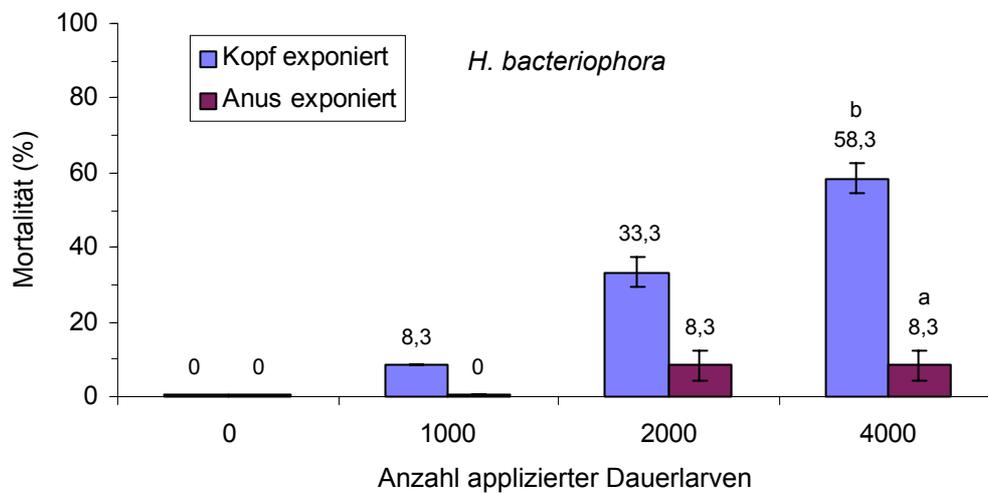


Abb. 3.17. Mortalität von *M. melolontha*-Larven (L3) 6 Tage nach 24stündiger Exposition des Kopfes oder des Anus bei unterschiedlicher Anzahl applizierter Dauerlarven von *H. bacteriophora*. Paarwerte, die durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander (Exakter Test nach Fisher, $\alpha < 0,05$).

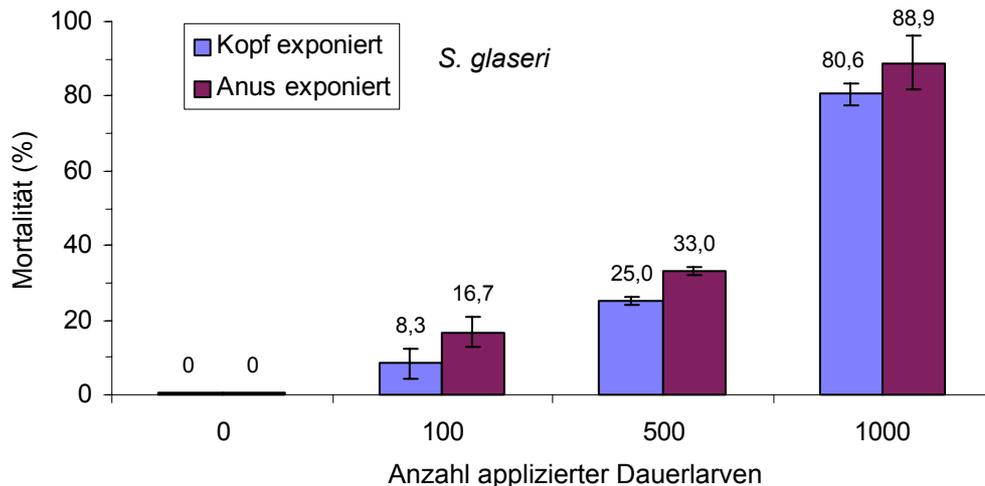


Abb. 3.18. Mortalität von *M. melolontha*-Larven (L3) 6 Tage nach 24stündiger Exposition des Kopfes oder des Anus bei unterschiedlicher Anzahl applizierter Dauerlarven von *S. glaseri*. Die einzelnen Paarwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Exakter Test nach Fisher, $\alpha < 0,05$).

Versiegelung des Mundes oder des Anus

Die Versiegelung des Mundes oder des Anus diente dazu herauszufinden, durch welche der beiden natürlichen Körperöffnungen die Nematoden effektiver in *M. melolontha*-Larven (L3) eindringen und ob sie auch direkt die Kutikula penetrieren können.

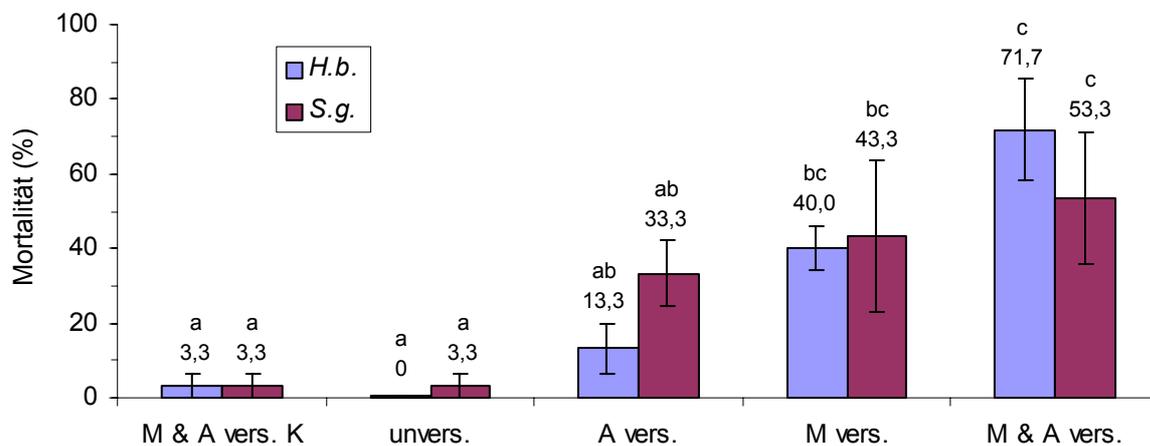


Abb. 3.19. Mortalität von *M. melolontha*-Larven (L3) 6 Tage nach Versiegelung von Körperöffnungen und 24 Stunden Exposition bei 2000 Dauerlarven von *H. bacteriophora* bzw. *S. glaseri*. Werte, die mit mindestens einem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Duncan-Test, $\alpha < 0,05$). M & A vers. K = Mund und Anus versiegelt ohne Nematoden (Kontrolle); unvers. = ohne Versiegelung (Kontrolle); A vers. = Anus versiegelt; M vers. = Mund versiegelt; M & A vers. = Mund und Anus versiegelt.

Aus Abb. 3.19 ist ersichtlich, dass die Mortalität der *M. melolontha*-Larven bei beiden Nematodenarten in der Reihenfolge der Behandlungen „Anus versiegelt“, „Mund versiegelt“,

„Mund und Anus versiegelt“ zunimmt. Abb. 3.20 zeigt, dass die Anzahl der insgesamt penetrierten Dauerlarven nur bei *S. glaseri* durch die Versiegelung deutlich reduziert wurde, während sie bei *H. bacteriophora* nahezu gleich groß blieb. Aufgrund der großen Schwankungen sind die Paarwerte in Abb. 3.20 jedoch nur teilweise signifikant verschieden.

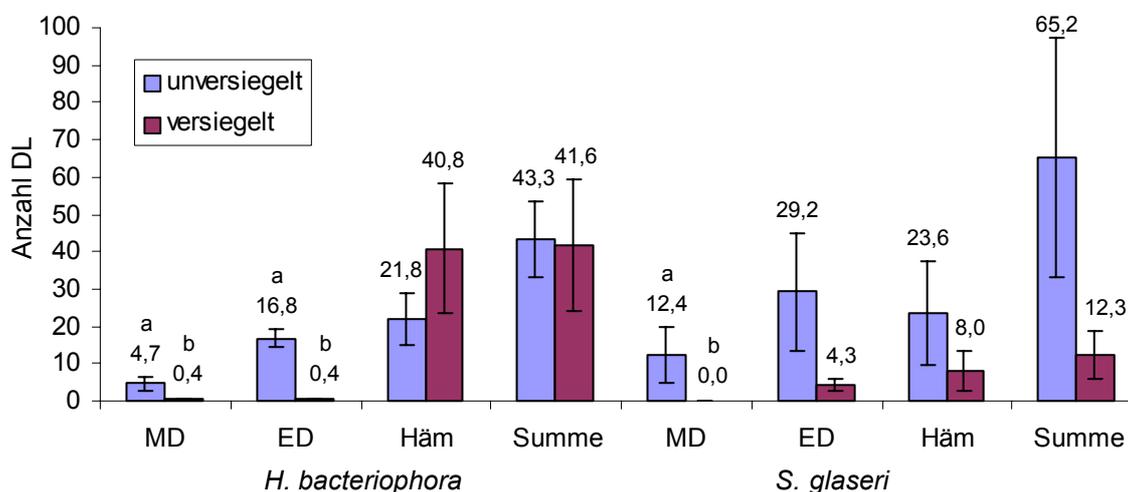


Abb. 3.20. Vergleich von Anzahl und Aufenthaltsort der in *M. melolontha*-Larven (L3) eingedrungenen Dauerlarven von *H. bacteriophora* und *S. glaseri* bei versiegelten (Mund und Anus versiegelt) und unversiegelten Larven. Die Auszählung erfolgte 48 Stunden nach Applikation von 2000 Dauerlarven. Nur Paarwerte, die mit ungleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander (Wilcoxon-Test, $\alpha < 0,05$). MD = Mitteldarm; ED = Enddarm; Häm = Hämolymphe; unversiegelt = ohne Versiegelung (Kontrolle); versiegelt = Mund und Anus versiegelt.

3.4.3 Resistenz gegenüber dem Abwehrsystem von *M. melolontha*-Larven

In den folgenden Versuchen sollte die Resistenz der Nematoden gegenüber den verschiedenen Bereichen des Abwehr- und Immunsystems der *M. melolontha*-Larven untersucht werden.

Resistenz gegenüber Darmsaft

Nematoden, die über den Mitteldarm oder den Enddarm in das Hämocoel des Insekts eindringen, müssen resistent gegenüber dem Darmsaft (Verdauungsenzyme, toxische Bestandteile, reduzierende Bedingungen) sein und die Darmwand penetrieren können. In diesem Versuch sollte die Resistenz der Dauerlarven von *H. bacteriophora* und *S. glaseri* gegenüber unverdünntem Darmsaft des Mitteldarms und des Enddarms von *M. melolontha*-Larven (L3) bei unterschiedlichen Inkubationszeiten *in vitro* ermittelt werden.

Nach 24 h Inkubation in Darmsaft des Mitteldarms von *M. melolontha*-Larven waren rund 60% und nach 48 h rund 90% der Dauerlarven von *H. bacteriophora* tot (Abb. 3.21). Als tot

wurden Dauerlarven deklariert, deren Körper gestreckt war und die sich auch nach Berührung mit einer Nadel nicht bewegten. Bei *S. glaseri* waren selbst nach 48 h weniger als 10% der Dauerlarven tot (Abb. 3.22). Demnach sind Dauerlarven von *H. bacteriophora* weitaus empfindlicher gegenüber Darmsaft des Mitteldarms bzw. Enddarms als Dauerlarven von *S. glaseri* (Abb. 3.21 und 3.22).

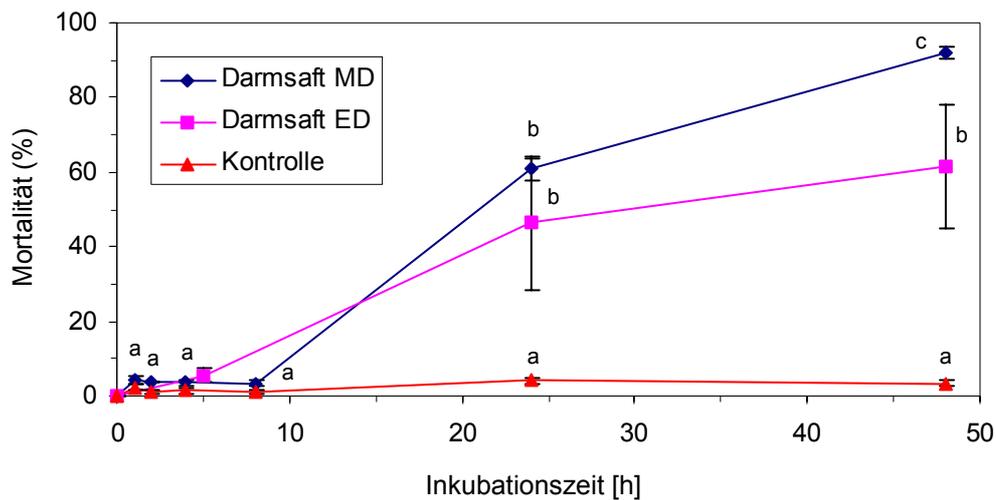


Abb. 3.21. Mortalität der Dauerlarven von *H. bacteriophora* bei unterschiedlich langer Inkubation in Darmsaft des Mitteldarms (MD) und des Enddarms (ED) von *M. melolontha*-Larven (L3) *in vitro*. In der Kontrolle waren die Dauerlarven in Insekten-Ringerlösung inkubiert. Werte, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander (Tukey-Test, $\alpha < 0,05$).

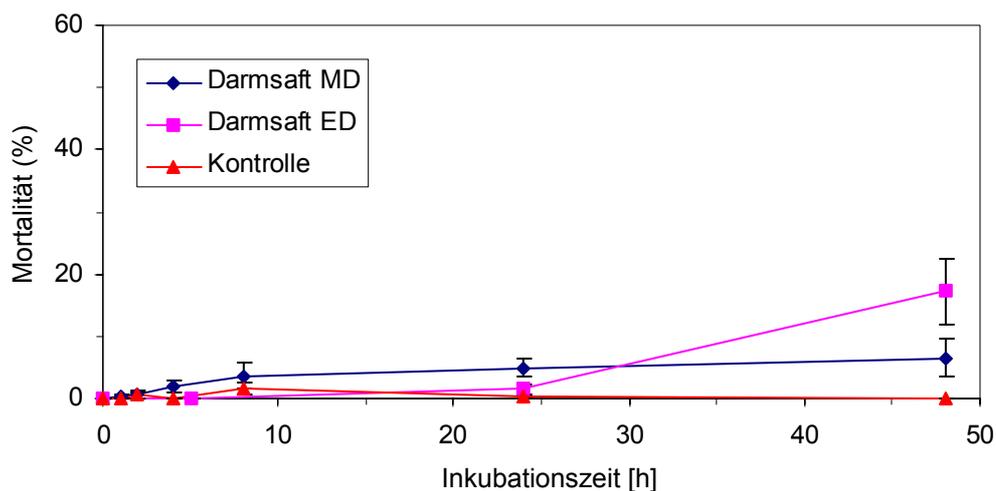


Abb. 3.22. Mortalität der Dauerlarven von *S. glaseri* bei unterschiedlich langer Inkubation in Darmsaft des Mitteldarms (MD) und des Enddarms (ED) von *M. melolontha*-Larven (L3) *in vitro*. In der Kontrolle waren die Dauerlarven in Insekten-Ringerlösung inkubiert. Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Tukey-Test, $\alpha < 0,05$).

Resistenz gegenüber Hämolymphe

Sind die Nematoden erfolgreich in das Hämocoel eines Insekts eingedrungen, werden sie mit dessen Immunsystem konfrontiert. Als Abwehr gegenüber Eindringlingen in der Größenordnung der Nematoden haben Insekten vor allem die zelluläre und enzymatisch vermittelte Einkapselung entwickelt. Mit weiteren Komponenten des Immunsystems (hämocytotoxische Zellen, antibakterielle Substanzen, Melanisierung) werden dann die freigelassenen symbiotischen Bakterien der Nematoden konfrontiert. In diesem Versuch sollte die Resistenz der Nematoden gegenüber der Hämolymphe sowie der Zeitpunkt des erstmaligen Nachweises der symbiotischen Bakterien in der Hämolymphe untersucht werden. Hierzu wurden Dauerlarven *in vitro* in Hämolymphe, die zuvor unter sterilen Bedingungen *M.m.*-Larven entnommen wurde, inkubiert.

Bei *H. bacteriophora* waren rund 60% der Dauerlarven nach 48 h Inkubation in Hämolymphe von *M. melolontha*-Larven tot. Bei *S. glaseri* waren es rund 50% (Abb. 3.23). Die Unterschiede zwischen beiden Nematodenarten sind im Gegensatz zu den vergleichbaren Versuchen mit Darmsaft (Abb. 3.21 und 3.22) nur gering und unterscheiden sich bis auf einen Wert (nach 48 h bei *H.b.*) nicht signifikant von den Kontrollen (Abb. 3.23). Die Dauerlarven starben in der Hämolymphe später als im Darmsaft. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Hämolymphe (*in vitro*) im Vergleich zum Darmsaft weniger toxisch wirkt.

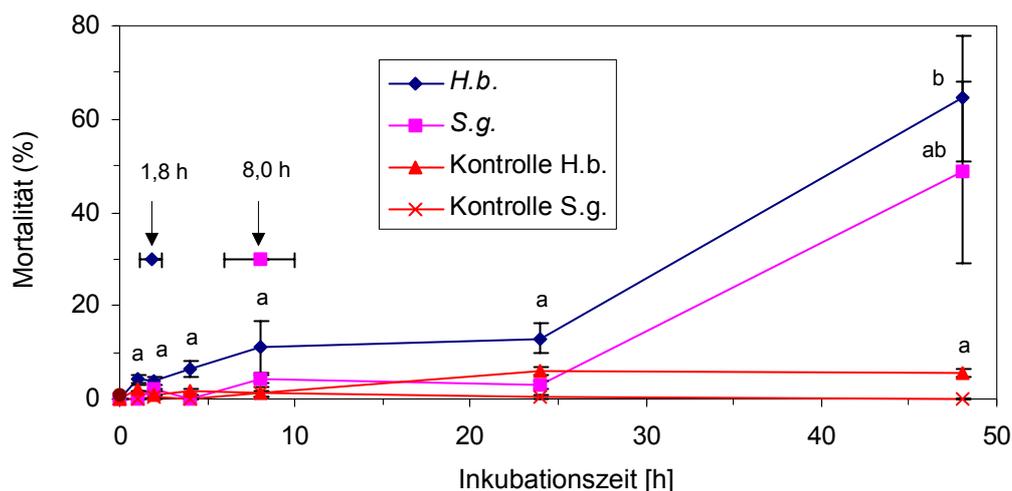


Abb. 3.23. Mortalität der Dauerlarven von *H. bacteriophora* und *S. glaseri* bei unterschiedlich langer Inkubation in Hämolymphe von *M. melolontha*-Larven (L3) *in vitro*. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt des erstmaligen Nachweises der symbiotischen Bakterien in der Hämolymphe. In der Kontrolle waren die Dauerlarven in Insekten-Ringerlösung inkubiert. Werte, die mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich signifikant voneinander (Duncan-Test, $\alpha < 0,05$).

Der durchschnittliche erstmalige Nachweis der symbiotischen Bakterien in der Hämolymphe lag bei *H. bacteriophora* bei etwa 1,8 h und bei *S. glaseri* bei etwa 8 h (Abb. 3.23) nach Zugabe von oberflächensterilisierten Dauerlarven. Dies ist ein Hinweis dafür, dass Dauerlarven von *H. bacteriophora* ihre symbiotischen Bakterien früher entlassen als Dauerlarven von *S. glaseri*. Das Ergebnis könnte aber auch dadurch zustande kommen, dass Dauerlarven von *H. bacteriophora* wesentlich mehr Bakterien enthalten und dadurch deren visueller Nachweis bei 1000facher Vergrößerung mit höherer Wahrscheinlichkeit gelingt als bei *S. glaseri*. Bei den Dauerlarven von *S. glaseri* waren in einigen Ansätzen bereits nach kurzer Zeit zahlreiche kokkenartige Bakterien nachweisbar. Unklar blieb, ob diese Fremdbakterien trotz der Oberflächensterilisierung an der Außenseite der Dauerlarven oder in deren Darmtrakt enthalten waren. In den Ansätzen, bei denen diese Bakterien vorkamen, war eine auffallend schnelle und starke Melanisierung der Hämolymphe zu beobachten.

Phenoloxidase-Aktivität der Hämolymphe verschiedener Insektenlarven

Die zelluläre und humorale Einkapselung von eingedrungenen Mikroorganismen wie Bakterien und Pilzen sowie Parasiten wie Nematoden ist ein wichtiger Bestandteil des Immunsystems bei Insekten. Die humorale Einkapselung erfolgt durch die Kettenreaktion der Melanisierung. Das wichtigste Enzym dieser Reaktion ist die Phenoloxidase. Über die Messung der Phenoloxidase-Aktivität der Hämolymphe verschiedener Insektenlarven und Larvenstadien sollte geprüft werden, ob dieser Faktor einen Einfluss auf die Empfindlichkeit der jeweiligen Larve gegenüber dem Nematoden-Bakterien-Komplex hat.

Aus Abb. 3.24 ist ersichtlich, dass die Phenoloxidase-Aktivität in der Hämolymphe der *Galleria*- und *Tenebrio*-Larven wesentlich höher ist als bei den Scarabaeiden-Larven. Da *Galleria*- und *Tenebrio*-Larven weitaus anfälliger gegenüber entomopathogenen Nematoden sind, lässt sich daraus ableiten, dass die Phenoloxidase-Aktivität für die unterschiedliche Anfälligkeit der Larven keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt. Die wesentlichste Ursache für die hohe Anfälligkeit der *Galleria*- und *Tenebrio*-Larven dürfte sein, dass die Nematoden im Gegensatz zu den Scarabaeiden-Larven relativ leicht in die Larven eindringen können (vgl. Abschnitt 3.4.2). Dies wiederum ist in erster Linie durch äußere und innere strukturelle Merkmale (Dicke der Kutikula, morphologische Strukturen, Dicke und Festigkeit der Darmwand) bedingt.

Die Enzym-Aktivität in den L3-Larven von *M. melolontha* ist etwa um den Faktor 53 höher als in den L2-Larven (Abb. 3.24). Für die unterschiedliche Anfälligkeit der beiden

Larvenstadien könnte die Phenoloxidase daher eine Rolle spielen, da sich die Larvenstadien äußerlich vergleichsweise wenig unterscheiden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die L2-Larven nach hämocoaler Injektion der symbiotischen Bakterien weitaus anfälliger sind als die L3-Larven (vgl. Abschnitt 3.3.3).

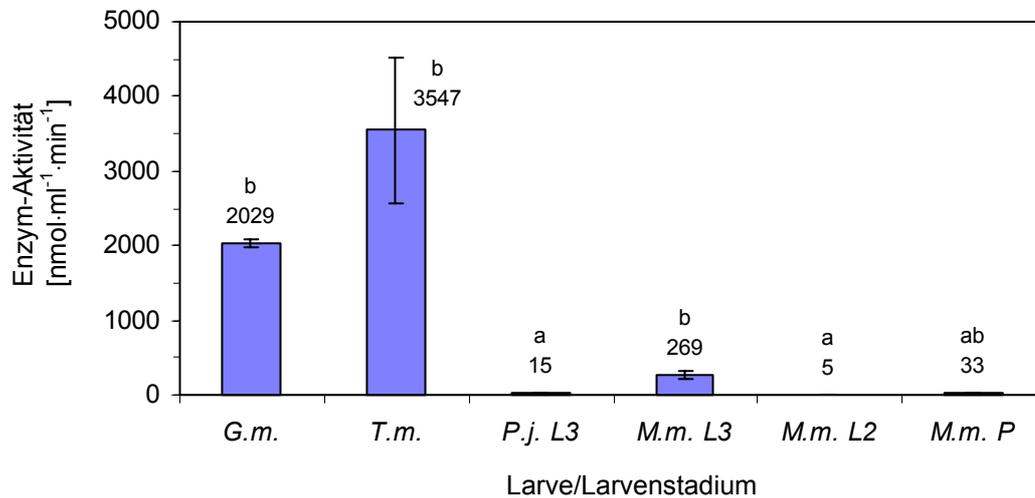


Abb. 3.24. Vergleich der Phenoloxidase-Aktivität in der Hämolymphe verschiedener Insektenlarven und Larvenstadien. Die Enzym-Aktivität wurde spektrophotometrisch über die Umsetzung von Dopamin zu Dopaminchinon gemessen. Werte, die mit mindestens einem gemeinsamen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Kruskal-Wallis-Test, $\alpha < 0,001$). G.m. = *Galleria mellonella*, T.m. = *Tenebrio molitor*, P.j. = *Popillia japonica*, M.m. = *Melolontha melolontha*, L2, L3 = Larvenstadien, P = Puppe.

3.4.4 Das Vermehrungspotential der Nematoden in verschiedenen Insektenlarven

Die Nematoden vermehren sich in verschiedenen Insektenarten unterschiedlich gut. Auch innerhalb der gleichen Insektenart zeigen sich häufig Unterschiede in der Anzahl produzierter Dauerlarven pro Wirt. Das Vermehrungspotential der Nematoden wurde untersucht, um einen Anhaltspunkt für die ökologische Beurteilung (Ressourcennutzung, Gesamtbilanz) des jeweiligen Insekts für die Nematodenart zu erhalten. Die Ermittlung des Vermehrungspotentials war auch für die Durchführung der Selektion auf höhere Infektiosität von Bedeutung, da die Nematoden in den *M. melolontha*-Larven vermehrt wurden.

Für *H. bacteriophora* ist das Vermehrungspotential in *Galleria*-Larven deutlich höher als in den Scarabaeiden-Larven und den *Tenebrio*-Larven, während zwischen den verschiedenen Scarabaeiden-Larven als auch zwischen dem L2- und L3-Stadium kein großer Unterschied besteht (Abb. 3.25). Für *S. glaseri* ist das Vermehrungspotential für alle getesteten

Insektenlarven etwa gleich groß aber deutlich (etwa um den Faktor 2-8) kleiner als bei *H. bacteriophora* (Abb. 3.25).

Charakteristisch für das Vermehrungspotential beider Nematodenarten und unabhängig vom Vermehrungswirt waren große Schwankungen. Häufig wiesen infizierte Larven die typische Verfärbung auf und trotzdem vermehrten sich die Nematoden nicht, d.h. es wanderten keine neuen Dauerlarven aus dem Kadaver. Dies trat bei *H. bacteriophora* häufiger auf als bei *S. glaseri*. Mögliche Ursachen hierfür werden im Diskussionsteil besprochen (Abschnitt 4.4.9 und 4.5.7).

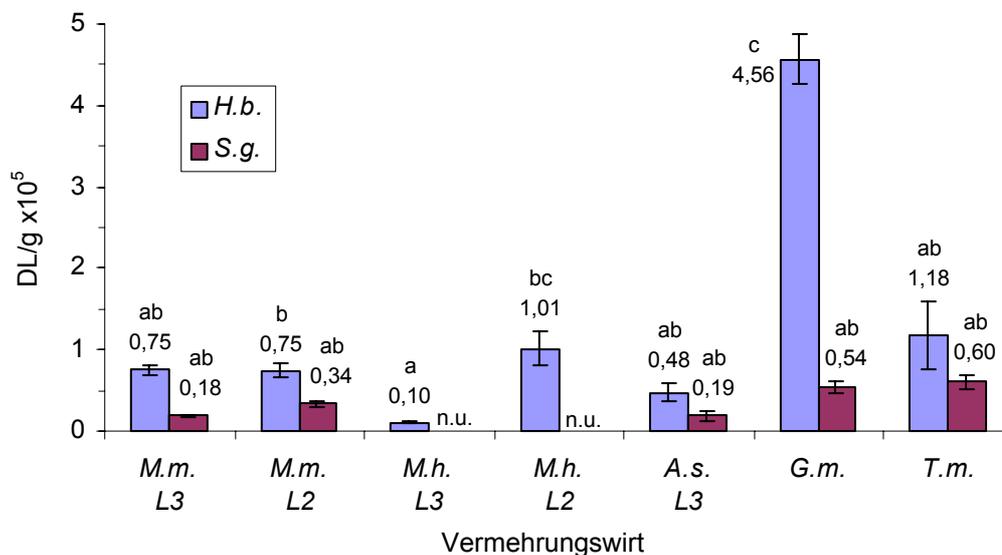


Abb. 3.25. Vermehrungspotential der Nematodenarten *H. bacteriophora* und *S. glaseri* in verschiedenen Insektenlarven. Angegeben ist die Zahl der Dauerlarven pro g Lebendgewicht der Insektenlarve. Mittleres Gewicht der Larven: *M.m.*-L2: $0,473 \pm 0,037$ g; *M.m.*-L3: $1,786 \pm 0,054$ g; *M.h.*-L3: $1,405 \pm 0,041$ g; *A.s.*-L3: $0,623 \pm 0,039$ g; *G.m.*: $0,323 \pm 0,009$ g; *T.m.*: $0,100 \pm 0,004$ g; n.u. = nicht untersucht. Werte, die mit mindestens einem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Kruskal-Wallis-Test, Methode nach Dunn, $\alpha < 0,05$).

3.4.5 Modelle zur Beschreibung der Befallsstrategie

Das Infektionsverhalten (Befallsstrategie) der Nematoden im Hinblick auf die Wahrscheinlichkeit einer Infektion und die Verteilung der Nematoden innerhalb und außerhalb eines Wirts in Abhängigkeit von der Nematoden-Dichte wurde mit vier Verteilungsmodellen verglichen (vgl. Abschnitt 2.5.2). Es sollte das von der Nematodenart, der Insektenart und vom Testsystem abhängige, jeweils am besten geeignete Modell ermittelt werden. Das geeignetste Modell lässt Verallgemeinerungen für die Befallsstrategie der Nematoden in Bezug auf das untersuchte Insekt zu. Damit lassen sich auch Schlussfolgerungen auf eine Wirtspräferenz (Spezifität) ableiten. Verteilungsmodelle machen

Aussagen über (1) die Wahrscheinlichkeit einer Erst-, Zweit-, Dritt- (usw.) Infektion, (2) die Aggregation der Nematoden in einem Wirt in Abhängigkeit von der Dichte, (3) die „Zufälligkeit“ einer Infektion, d.h. inwieweit eine Infektion als zufällig anzusehen ist.

Zur Beschreibung des Infektionsverhaltens wurden die Negative Binomial-Verteilung (NBV), die Binomial-Verteilung in ihrer Grundform (BV) und einer erweiterten Form (EBV) und die Poisson-Verteilung (PV) geprüft (z.B. Stahel, 1995; vgl. Abschnitt 2.5.2). Die intraspezifische Konkurrenz (Abschnitt 3.4.6) wurde mit einem Modell für Dichteabhängigkeiten ermittelt. Für jedes Modell erfolgte eine computergestützte Parameterschätzung.

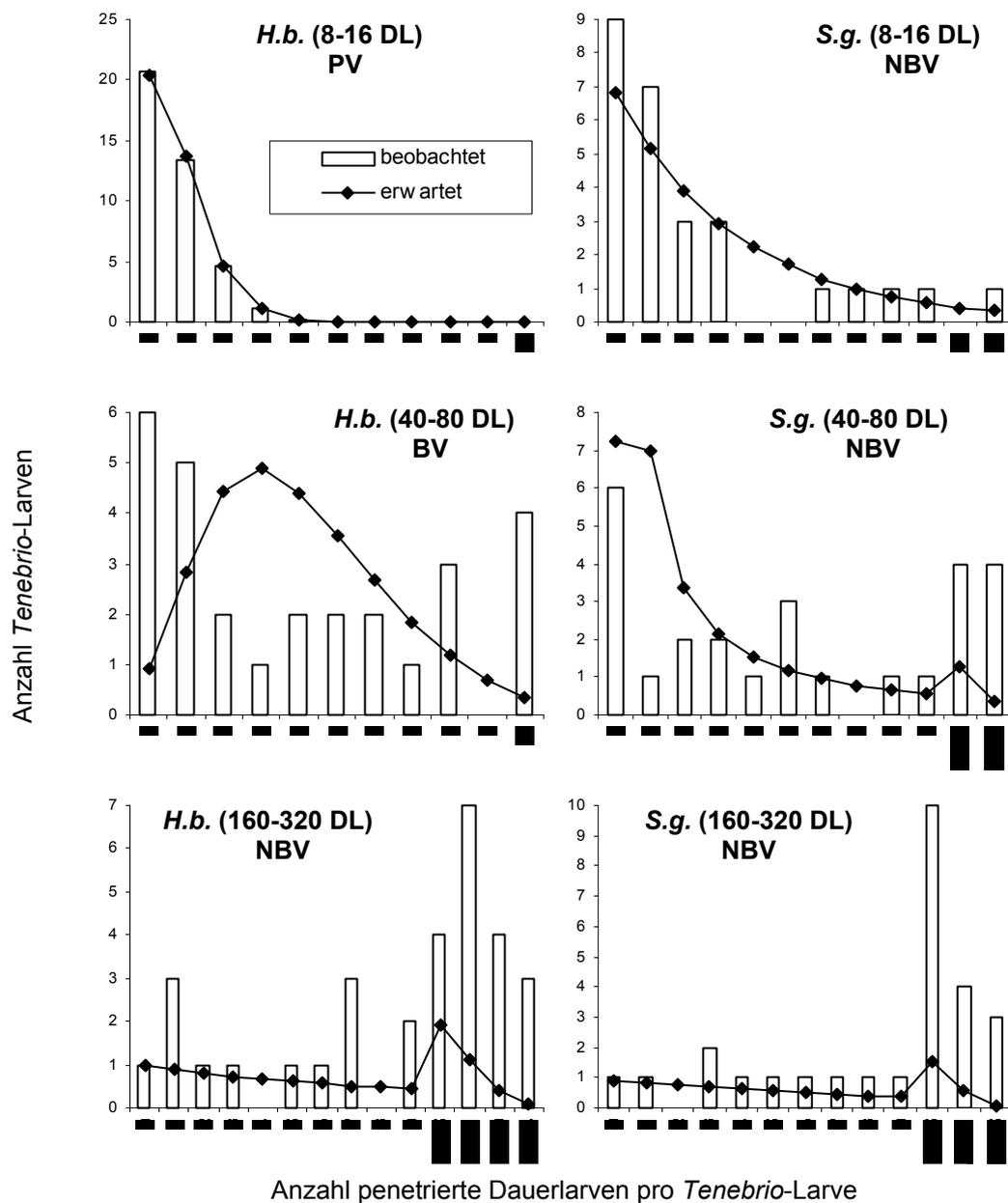


Abb. 3.26. Grafische Darstellung der berechneten Häufigkeitsverteilung der jeweils am besten passenden Verteilungsfunktion (Linie) und der gefundenen Häufigkeitsverteilung (Balken) für die Anzahl der in eine *Tenebrio*-Larve penetrierten Dauerlarven im **Testsystem I**.

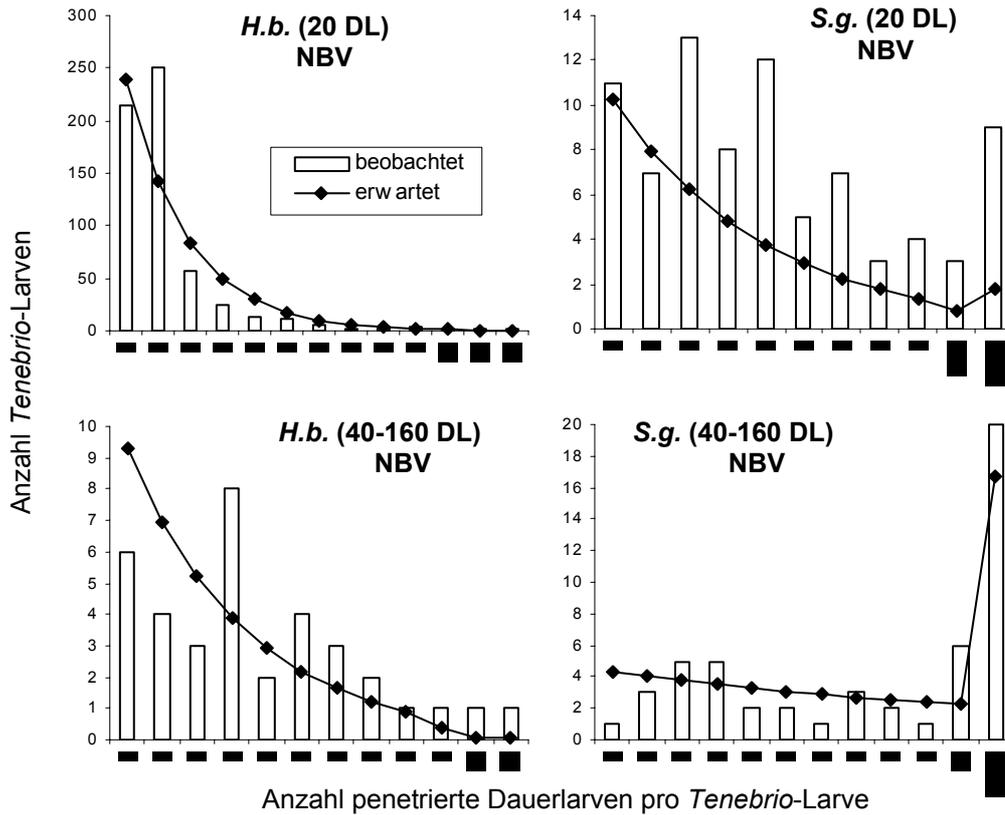


Abb. 3.27. Grafische Darstellung der berechneten Häufigkeitsverteilung der jeweils am besten passenden Verteilungsfunktion (Linie) und der gefundenen Häufigkeitsverteilung (Balken) für die Anzahl der in eine *Tenebrio*-Larve penetrierten Dauerlarven im **Testsystem II**.

Tab. 3.7. Wahrscheinlichkeit für die Erstpenetration (p_1) und die Zweit- und Folgepenetration (p_2) eines Nematoden. Die Werte für p_1 wurden mit der Maximum-Likelihood-Methode nach der Gleichung von Peto (1953) berechnet (Programm Probitpc, Vers. 2.0, Dr. Arne Peters). Die Werte für p_2 wurden bei *T.m.* und *M.m.* (L2) wie bei der Binomial-Verteilung angegeben ermittelt (vgl. Abschnitt 2.5.2), bei *M.m.* (L3) und *T.m.* (Testsystem I) entsprechen sie den in Tab. 3.6 angegebenen α -Werten. Die Chi-Quadrat-Werte (χ^2) beziehen sich auf p_1 und sind ein Maß für die Abweichung der ermittelten Daten von den Modelldaten der Gleichung von Peto (1953). Die mit * gekennzeichneten Daten weichen signifikant von den Modelldaten ab ($\alpha < 0,05$). FG = Freiheitsgrade.

Nematodenart	Wirtsinsekt	Testsystem	$p_1 \pm SE$	χ^2 (FG)	$p_2 \pm SE$	p_2/p_1
<i>H.b.</i>	<i>M.m.</i> (L3)	I	0,0004 \pm 0,0002	2,79 (4)	0,0085 \pm 0,0012	21,3
	<i>M.m.</i> (L2)	I	0,0011 \pm 0,0005	7,12 (4)	0,0757 \pm 0,0238	68,8
	<i>T.m.</i>	I	0,1013 \pm 0,0295	132,12 (5)*	0,1100 \pm 0,0292	1,1
	<i>T.m.</i>	II	0,0635 \pm 0,0064	27,18 (7)*	0,0640 \pm 0,0038	1,0
	<i>T.m.</i> ¹	II	0,0347 \pm 0,0167	-	-	-
<i>S.g.</i>	<i>M.m.</i> (L3)	I	0,0146 \pm 0,0049	9,39 (4)	0,1398 \pm 0,0243	9,6
	<i>M.m.</i> (L2)	I	0,0191 \pm 0,0034	14,65 (4)*	0,2338 \pm 0,0564	12,2
	<i>T.m.</i>	I	0,1249 \pm 0,0133	467,19 (5)*	0,0981 \pm 0,0348	0,8
	<i>T.m.</i>	II	0,2743 \pm 0,0321	10,13 (5)	0,2373 \pm 0,0552	0,9
	<i>T.m.</i> ¹	II	0,1458 \pm 0,0413	-	-	-

¹ Mittelwert aus 6 Wiederholungen einer 1:1 Applikation (= ein Nematode pro *Tenebrio*-Larve; n = 24)

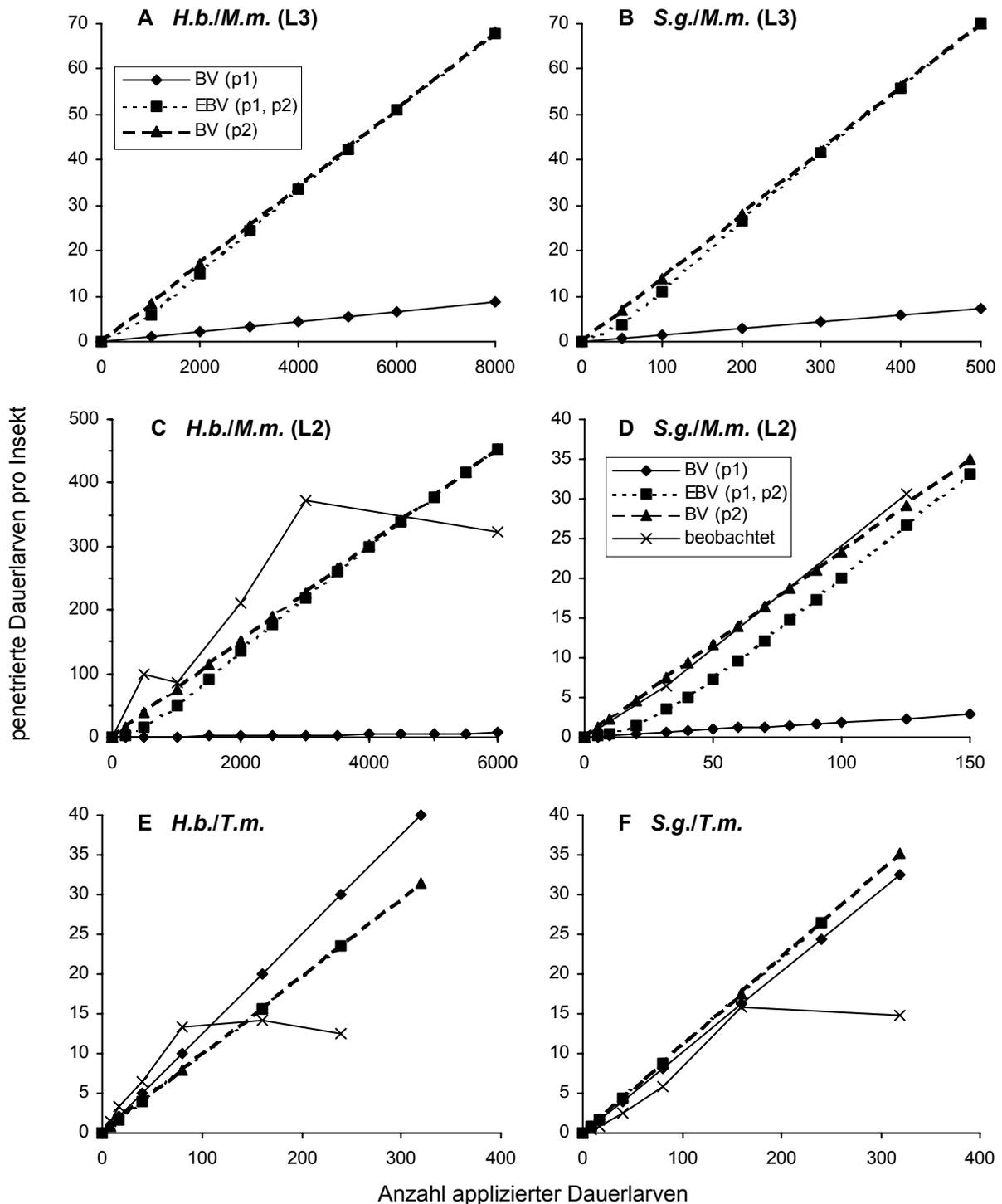


Abb. 3.28. Vergleich der Vorhersagen der Anzahl penetrierter Nematoden durch die Binomial-Verteilung und die erweiterte Binomial-Verteilung mit den Wahrscheinlichkeiten der Erst- (p_1) sowie der Zweit- und Folgepenetration (p_2). BV (p_1) = Binomial-Verteilung mit der Wahrscheinlichkeit der Erstpenetration; BV (p_2) = Binomial-Verteilung mit der Wahrscheinlichkeit der Zweit- und Folgepenetration; EBV (p_1, p_2) = erweiterte Binomial-Verteilung mit beiden Wahrscheinlichkeiten. **A., C. u. E.** *H. bacteriophora* bei *M. melolontha*-Larven (L3 u. L2) (**A u. C**) und *Tenebrio*-Larven (**E**) im Testsystem I. **B., D. u. F.** *S. glaseri* bei *M. melolontha*-Larven (L3 u. L2) (**B u. D**) und bei *Tenebrio*-Larven (**F**) im Testsystem I. Bei **A. u. B.** wurde p_2 nur bei einer Nematoden-Dichte (*H.b.* – 8000 DL; *S.g.* – 1000 DL) ermittelt. Man beachte die unterschiedliche Skalierung der Achsen.

Tab. 3.8. Ermittlung des Ausmaßes der Aggregation über Parameterbestimmung des Potenzgesetzes von Taylor (1961). Die Werte von a und b wurden durch lineare Regression von $\ln s^2$ (Varianzen) über $\ln m$ (Mittelwerte) ermittelt (vgl. Abschnitt 2.5.2). Die mit * gekennzeichneten Werte unterscheiden sich signifikant von 1 (t -Test, $\alpha < 0,05$). Die Korrelation der Datenpunkte der mit \diamond gekennzeichneten Zeilen ist signifikant (F-Test, $\alpha < 0,05$). KI = Konfidenzintervall. (vgl. auch Tab. 8.5)

Nematodenart	Wirtsinsekt	Testsystem	a	95% KI	b	95% KI	R_{adj}^2
<i>H.b.</i>	<i>M.m.</i> (L2)	I	3,254 ± 48,813	-132,3-138,8	1,642 ± 0,740	-0,412-3,696	0,50
	<i>T.m.</i>	I	1,430 ± 1,319	-1,962-4,822	1,687 ± 0,155*	1,288-2,086	0,96 \diamond
	<i>T.m.</i>	II	1,471 ± 1,298	-2,132-5,074	1,268 ± 0,149	0,854-1,682	0,94 \diamond
<i>S.g.</i>	<i>M.m.</i> (L2)	I	0,088 ± 2,992	-9,433-9,609	2,223 ± 0,264*	1,383-3,063	0,96 \diamond
	<i>T.m.</i>	I	1,682 ± 2,186	-3,938-7,302	1,815 ± 0,383	0,830-2,800	0,81 \diamond
	<i>T.m.</i>	II	0,435 ± 1,619	-4,059-4,929	2,291 ± 0,213*	1,700-2,882	0,97 \diamond

Wie aus Tab. 8.1 und 8.2 sowie Abb. 3.26 ersichtlich, wird bei niedrigen Nematoden-Dichten meist eine höhere Übereinstimmung der beobachteten Verteilung penetrierter Nematoden mit der von den Modellen erwarteten Verteilung erreicht als bei höheren.

Für *H. bacteriophora* wurde bei *Tenebrio*-Larven im Testsystem I von niedrigen (< 20 DL/Larve) zu hohen (> 160 DL/Larve) Nematoden-Dichten die beste Annäherung an die Versuchsdaten durch die Abfolge der Verteilungsfunktionen PV, BV und NBV erreicht (Abb. 3.26). Bei niedrigen Dichten stimmt die beobachtete Verteilung mit allen drei Verteilungsmodellen überein; die mit Abstand beste Übereinstimmung wird jedoch durch die PV erreicht (Tab. 8.1). Da die PV zudem das einfachste der drei Modelle ist, wird ihr in diesem Fall eindeutig der Vorzug gegeben. Die Infektion von *Tenebrio*-Larven durch *H. bacteriophora* bei niedrigen Nematoden-Dichten entspricht demzufolge einem zufälligen Vorgang (zufällige Verteilung).

Bei *S. glaseri* wird dagegen die beste Annäherung bereits bei niedrigen Nematoden-Dichten durch die NBV erreicht (Tab. 8.2). Daraus lässt sich ableiten, dass bei *S. glaseri* ein effektiveres (aktiveres, gezielteres) Aufsuchen der *Tenebrio*-Larven erfolgt und dichteabhängige Aggregationseffekte gewichtiger sind als bei *H. bacteriophora*.

Im Testsystem II wird die beste Annäherung der Verteilung penetrierter Nematoden, unabhängig von der Dichte und bei beiden Nematodenarten durch die NBV erreicht (Tab. 8.3 und 8.4; Abb. 3.27). Dieses Ergebnis verdeutlicht, dass die stringenteren Bedingungen des Testsystems II (erheblich geringeres Bodensubstratvolumen, nur eine *Tenebrio*-Larve vorhanden) die Aggregation der Nematoden im verfügbaren Insekt fördert. Die Testbedingungen erleichtern für die Nematoden wahrscheinlich das Finden und Kontaktieren der *Tenebrio*-Larve erheblich. Das Aufeinandertreffen beider wird wahrscheinlicher, so dass der Zufall für die Infektion auch bei *H. bacteriophora* an Bedeutung verliert.

Für *M. melolontha*-Larven wurde wegen der zu kleinen Datensätze kein Vergleich mit den Modellen dargestellt, die jeweils ermittelten Parameter sind den Tab. 3.6, 3.7 und 8.5 zu entnehmen.

Die Wahrscheinlichkeit der Erstpenetration wurde über die Gleichung von Peto (1953) ermittelt (vgl. Abschnitt 2.7.2). Die in dieser Gleichung enthaltene Wahrscheinlichkeit entspricht der Wahrscheinlichkeit, dass ein einzelner Nematode ein Insekt infiziert. Für *H. bacteriophora* ist diese Wahrscheinlichkeit mit $p_1 = 0,0004$ bei *M. melolontha*-Larven (L3) etwa 37 mal kleiner als bei *S. glaseri* ($p_1 = 0,0146$) (Tab. 3.7; Abb. 3.28). Dies bedeutet, dass, um die gleiche Wirkung zu erzielen, bei *S. glaseri* im Durchschnitt etwa 37 mal mehr Dauerlarven penetrieren als bei *H. bacteriophora*. Diese große Differenz bestätigt, dass für *H. bacteriophora* die Penetration in L3-Larven eine enorme Schwierigkeit darstellt und nur wenige penetrierte Dauerlarven ausreichen, um eine *M. melolontha*-Larve zu töten.

Bei *H. bacteriophora* ist die Wahrscheinlichkeit einer primären Penetration bei den L2-Larven um den Faktor 2,8 und bei *S. glaseri* um den Faktor 1,3 größer als bei L3-Larven (Tab. 3.7, Abb. 3.28). Auch bei L2-Larven ist die Wahrscheinlichkeit der Erstpenetration bei *H. bacteriophora* kleiner als bei *S. glaseri* (Faktor 17; Tab. 3.7).

Die Wahrscheinlichkeit der Zweit- und Folgepenetration wurde durch Auszählung der penetrierten Dauerlarven bei verschiedenen Dosierungen (bei *M.m.* L3-Larven nur bei einer Dosierung) ermittelt und dann durch den Term $\sum x_i / \sum N_i$ berechnet (Tab. 3.7; vgl. Abschnitt 2.5.2). Bei den *Tenebrio*-Larven liegen die Wahrscheinlichkeit der Erstpenetration und der Zweit- und Folgepenetration für beide Nematodenarten in der gleichen Größenordnung, d.h. $p_2/p_1 \approx 1$. Dies bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit der Zweit- und Folgepenetration von Nematoden nicht erhöht wird, wenn bereits eine Dauerlarve penetrierte. Dieser Befund beweist, dass die Penetration in *Tenebrio*-Larven für beide Nematodenarten kein Problem ist.

Im Gegensatz hierzu zeigen sich für beide Nematodenarten bei der Penetration in *M. melolontha*-Larven erhebliche Differenzen zwischen p_2 und p_1 (Tab. 3.7). Die Wahrscheinlichkeit der Zweit- und Folgepenetration ist für *H. bacteriophora* etwa um den Faktor 20-70 größer als für die Erstpenetration. Bei *S. glaseri* beträgt der Faktor etwa 9-12. Die Wahrscheinlichkeit p_2 charakterisiert die Größenordnung der Anzahl der sekundär penetrierenden Dauerlarven. Die große Differenz zwischen p_2 und p_1 bei *H. bacteriophora* lässt darauf schließen, dass ein erheblicher Anteil der Dauerlarven erst nach einer deutlichen Schwächung oder nach dem Tod der Larve in diese penetriert bzw. erst penetrieren kann.

Die Differenzen der Wahrscheinlichkeit der Zweit- und Folgepenetration (p_2) zwischen den beiden Nematodenarten sind erheblich kleiner als für die Wahrscheinlichkeit der Erstpenetration (p_1). Bei *M. melolontha*-Larven (L3) ist p_2 bei *H. bacteriophora* etwa um den

Faktor 16 und bei L2-Larven um den Faktor 3 kleiner als bei *S. glaseri*. Trotz einem deutlich größerem relativen Anteil sekundär penetrierender Nematoden bei *H. bacteriophora* ist p_2 also immer noch deutlich kleiner als bei *S. glaseri* (Tab. 3.7).

Die Wahrscheinlichkeit der Zweit- und Folgepenetration bei L3-Larven wurde lediglich anhand einer Nematoden-Dosis abgeschätzt. Da diese Dosierung für beide Nematodenarten jeweils die höchste war, bei *H.b.* 8000 DL und bei *S.g.* 1000 DL, kann dies zu einer leichten Unterschätzung von p_2 geführt haben, da bei diesen Nematoden-Dichten bereits mit intraspezifischer Konkurrenz zu rechnen ist (vgl. Abschnitt 3.4.6). Dies hätte dann auch eine Unterschätzung des in Tab. 3.7 angegebenen Verhältnis von p_2/p_1 zur Folge. Bei Berücksichtigung aller getesteter Dosierungen wäre dieses Verhältnis größer.

Die großen Differenzen zwischen p_2 und p_1 deuten darauf hin, dass die Erstpenetration in *M. melolontha*-Larven für die Nematoden ein weitaus größeres Problem darstellt als die sekundäre Penetration. Dieser Sachverhalt wird auch durch die Beobachtungen während der zahlreichen Auszählungen bestätigt: Es fanden sich meist Larven, die entweder relativ viele oder aber sehr wenige bzw. keine Dauerlarven enthielten, d.h. es war keine Normalverteilung der Daten gegeben. Aus diesen Beobachtungen lässt sich bereits ohne Wahrscheinlichkeitsberechnungen folgern, dass die erfolgreiche Infektion einer *M. melolontha*-Larve durch vergleichsweise wenig Dauerlarven zahlreiche weitere Dauerlarven anlockt.

Das Ausmaß der Aggregation wurde über das Potenzgesetz von Taylor (1961) abgeschätzt (vgl. Abschnitt 2.5.2). Vor allem der Parameter b , der im Exponenten steht, ist dabei ein Maß für die Aggregation. Je größer dieser Wert, desto höher die Aggregation der Nematoden in einem Insekt. Bis auf die Kombination *H.b./M.m.* (L2) waren die Datenpunkte der einzelnen Regressionsanalysen aus Tab. 3.8 signifikant korreliert. Das adjustierte Bestimmtheitsmaß war $> 0,8$. Das Fehlen einer signifikanten Korrelation bei *H. bacteriophora* bei *M. melolontha*-Larven (L2) weist darauf hin, dass bereits bei niedrigen Nematoden-Dichten die Verteilung der penetrierten Nematoden in den Larven sehr ungleich ist und daher mit einer hohen Varianz (s^2) einhergeht (Tab. 8.5).

Für *H. bacteriophora* ergaben sich niedrigere Werte für b , die im Bereich von etwa 1,2-1,7 lagen. Die höheren Werte bei *S. glaseri* lagen im Bereich von 1,8-2,3 (Tab. 3.8) und bestätigen, dass bei *S. glaseri* eine ausgeprägtere Aggregation der Nematoden in einem befallenen Insekt stattfindet.

Die Werte für den Parameter a weisen einen wesentlich höheren Standardfehler auf als die von b und unterscheiden sich daher in keinem Fall signifikant von 1 (Tab. 3.8). Dagegen unterscheidet sich bei *H. bacteriophora* der Wert von b bei *Tenebrio*-Larven im Testsystem I signifikant von 1. Das heißt, dass in diesem Fall die Verteilung der Nematoden auf die acht

zur Verfügung stehenden *Tenebrio*-Larven nicht zufällig erfolgte. Die bereits infizierten Larven wurden bevorzugt von weiteren Nematoden befallen, was zu einer aggregierten Verteilung führte. Bei *S. glaseri* unterscheiden sich die Werte von b bei *M. melolontha*-Larven (L2) und bei *Tenebrio*-Larven im Testsystem II signifikant von 1 (Tab. 3.8).

3.4.6 Intraspezifische Konkurrenz

Die Ermittlung der Anzahl penetrierender Nematoden in Abhängigkeit von der Nematodendichte sollte Aufschluss über das Ausmaß intraspezifischer Konkurrenz in Bezug auf das Penetrationsverhalten der Nematoden geben. Zur Beschreibung wurde ein von Bellows (1981) eingehend diskutiertes, universelles Modell für Dichteabhängigkeiten verwendet. Die Herleitung eines einfacheren Grundmodells findet sich z.B. in Begon *et al.* (1991). Das Modell ermöglicht eine Bewertung des Verhaltens der Nematoden bei unterschiedlichen Dichten, insbesondere im Hinblick auf intraspezifische Konkurrenz. Nach diesem Modell ist die Zahl der penetrierten Nematoden $P(N)$ in Abhängigkeit von der Nematodendichte (= Dosis = Anzahl applizierter Nematoden) durch folgende Gleichung gegeben:

$$P(N) = \frac{dN}{1 + (aN)^b} \quad (3.1)$$

wobei d , a und b die zu bestimmenden Parameter sind. Der Parameter d beschreibt das Niveau der dichteunabhängigen Penetrationsrate (= Anteil penetrierter Nematoden in Bezug auf Gesamtzahl applizierter Nematoden). Der Parameter a ist eine Skalierungskonstante, die für ein gegebenes b die Dichte festlegt, bei der die Penetrationsrate ihr Maximum erreicht. Dies entspricht der Nullstelle der ersten Ableitung von Gl. (3.1), welche durch die Dichte

$$N = (1/(a^b(b-1)))^{1/b} \quad (3.2)$$

gegeben ist. Wenn $b < 1$ folgt aus Gl. (3.1), dass die Kurve kein Maximum aufweist und stetig steigt. Der Parameter b beschreibt die Stärke der Dichteabhängigkeit und damit der intraspezifischen Konkurrenz. Dieser Parameter entspricht dem Interferenzkoeffizient (engl. *mutual interference constant*) in dem einfacheren Modell von Hassell (1970). Es können folgende Fälle unterschieden werden:

$b = 0$	-	Dichteunabhängigkeit, keine Konkurrenz
$b < 1$	-	Unterkompensation, kaum Konkurrenz
$b = 1$	-	Kompensation, reine Wettbewerbskonkurrenz (engl. <i>contest competition</i>)
$b \gg 1$	-	Überkompensation, Balgereikonkurrenz (engl. <i>scramble competition</i>)

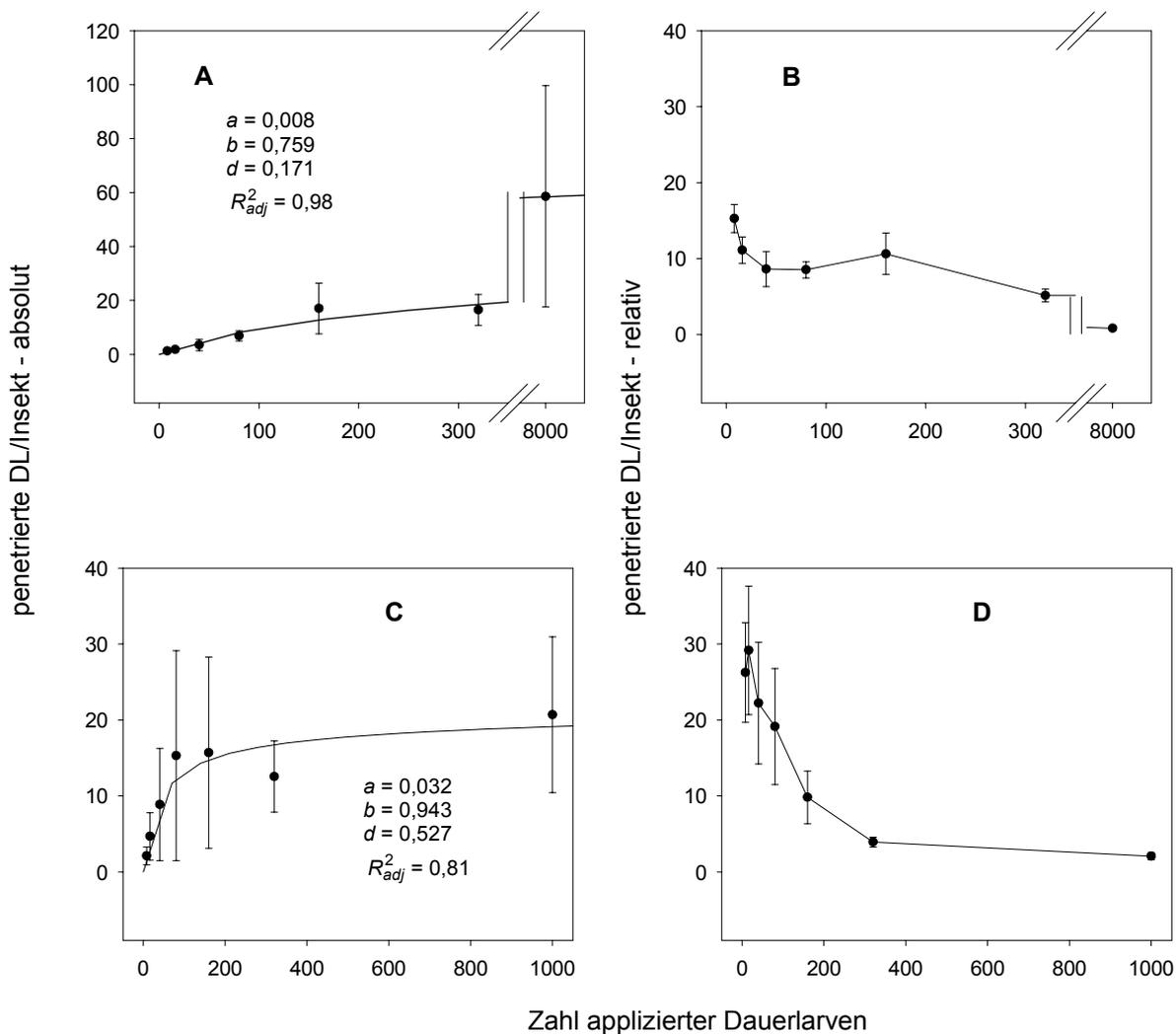


Abb. 3.29. Intraspezifische Konkurrenz außerhalb des Wirts für die Penetration von *H. bacteriophora* (A, B) und *S. glaseri* (C, D) in *Tenebrio*-Larven im Testsystem I. **A., C.** Absolute Zahl der penetrierten Dauerlarven (DL) mit der angepassten Kurve nach Bellows (1981). Dargestellt sind die Mittelwerte und die jeweiligen 95% Konfidenzintervalle. **B., D.** Relative Zahl der penetrierten Dauerlarven in Prozent bezogen auf die Zahl applizierter Nematoden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern.

Bei *H. bacteriophora* liegen alle ermittelten Werte für b etwa zwischen 0,2 und 0,7. Für diese Art ist unter den gegebenen Bedingungen somit kein Einfluss von Konkurrenz unter den Nematoden auf das Penetrationsverhalten nachweisbar. Im Gegensatz hierzu wurden bei *S. glaseri* bei *Tenebrio*-Larven im Testsystem II und bei *M. melolontha*-Larven (L2) für b Werte zwischen 1 und 2 ermittelt (Abb. 3.30 C und 3.31 C). Dies deutet auf eine „Wettbewerbskonkurrenz“ unter den Nematoden hin. Für diese Kurven ist die berechnete Nematoden-Dichte mit dem Maximum der Penetrationsrate angegeben (bei *M.m.* 1587 DL und bei *T.m.* 251 DL). Ab dieser Nematoden-Dichte nimmt die Penetrationsrate wieder deutlich ab.

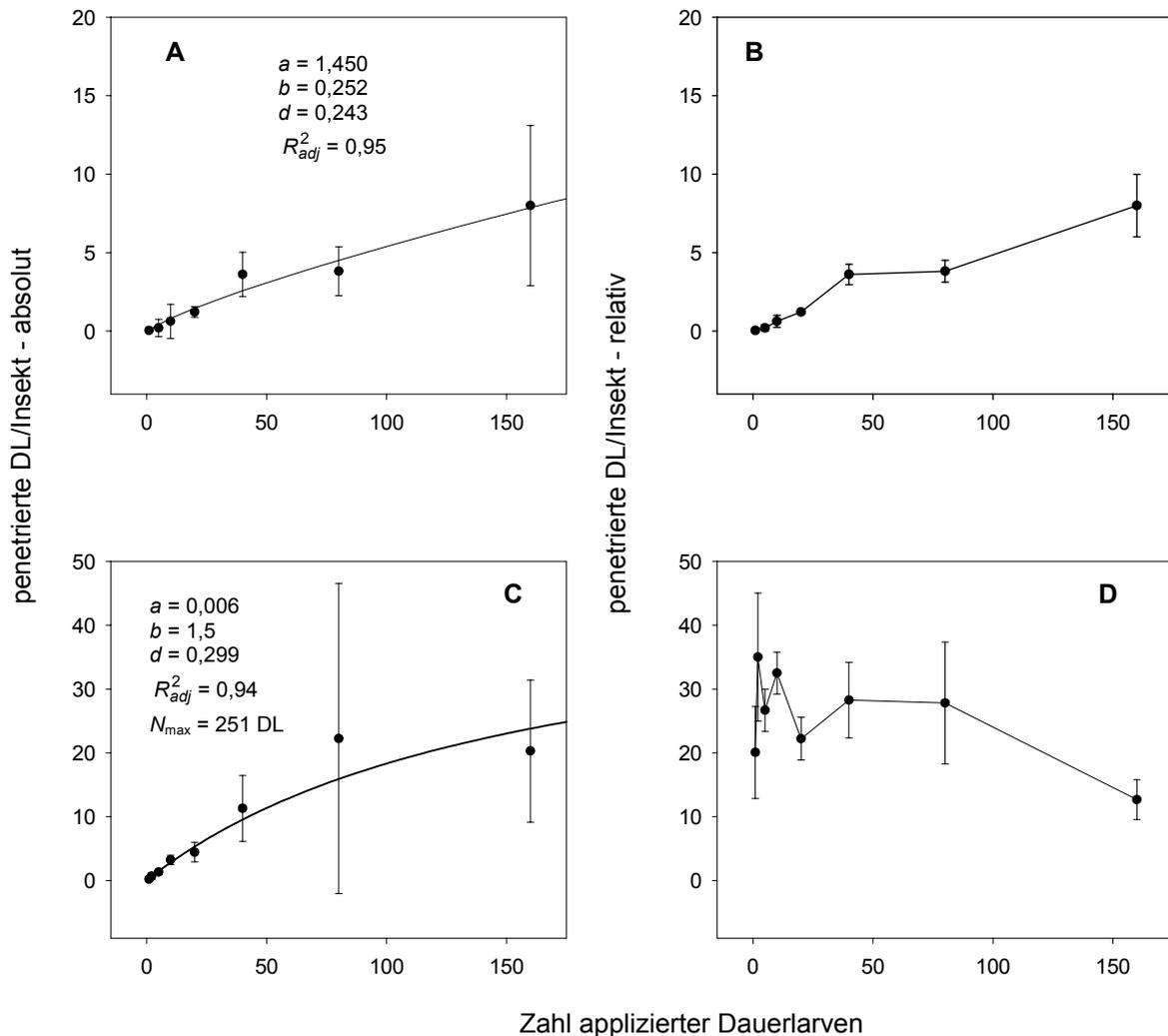


Abb. 3.30. Intraspezifische Konkurrenz für die Penetration von *H. bacteriophora* (A, B) und *S. glaseri* (C, D) in *Tenebrio*-Larven im **Testsystem II**. **A., C.** Absolute Zahl der penetrierten Dauerlarven (DL) mit der angepassten Kurve nach Bellows (1981). Dargestellt sind die Mittelwerte und die jeweiligen 95% Konfidenzintervalle. **B., D.** Relative Zahl der penetrierten Dauerlarven in Prozent bezogen auf die Zahl applizierter Nematoden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern.

Beim Vergleich der Diagramme für das Testsystem I und II bei *Tenebrio*-Larven und *M. melolontha*-Larven (Abb. 3.29-3.31) fällt bei beiden Nematodenarten auf, dass die Konkurrenz im Testsystem I ein größeres Ausmaß annimmt, obwohl dort die Nematodendichte bezogen auf das zur Verfügung stehende Bodensubstrat (TS I: 22 g, TS II: 0,2 g) bedeutend kleiner als im Testsystem II ist: Die höchste Nematodendichte pro Gramm Bodensubstrat ist im TS I bei *H.b.* ≈ 365 DL und bei *S.g.* ≈ 45 DL. Im TS II beträgt die höchste Dichte bei beiden Arten etwa 800 DL/g. Dieses Ergebnis wird jedoch plausibel, wenn berücksichtigt wird, dass im Testsystem I den Nematoden jeweils acht *Tenebrio*-Larven zur Verfügung standen, während es im Testsystem II jeweils nur eine war.

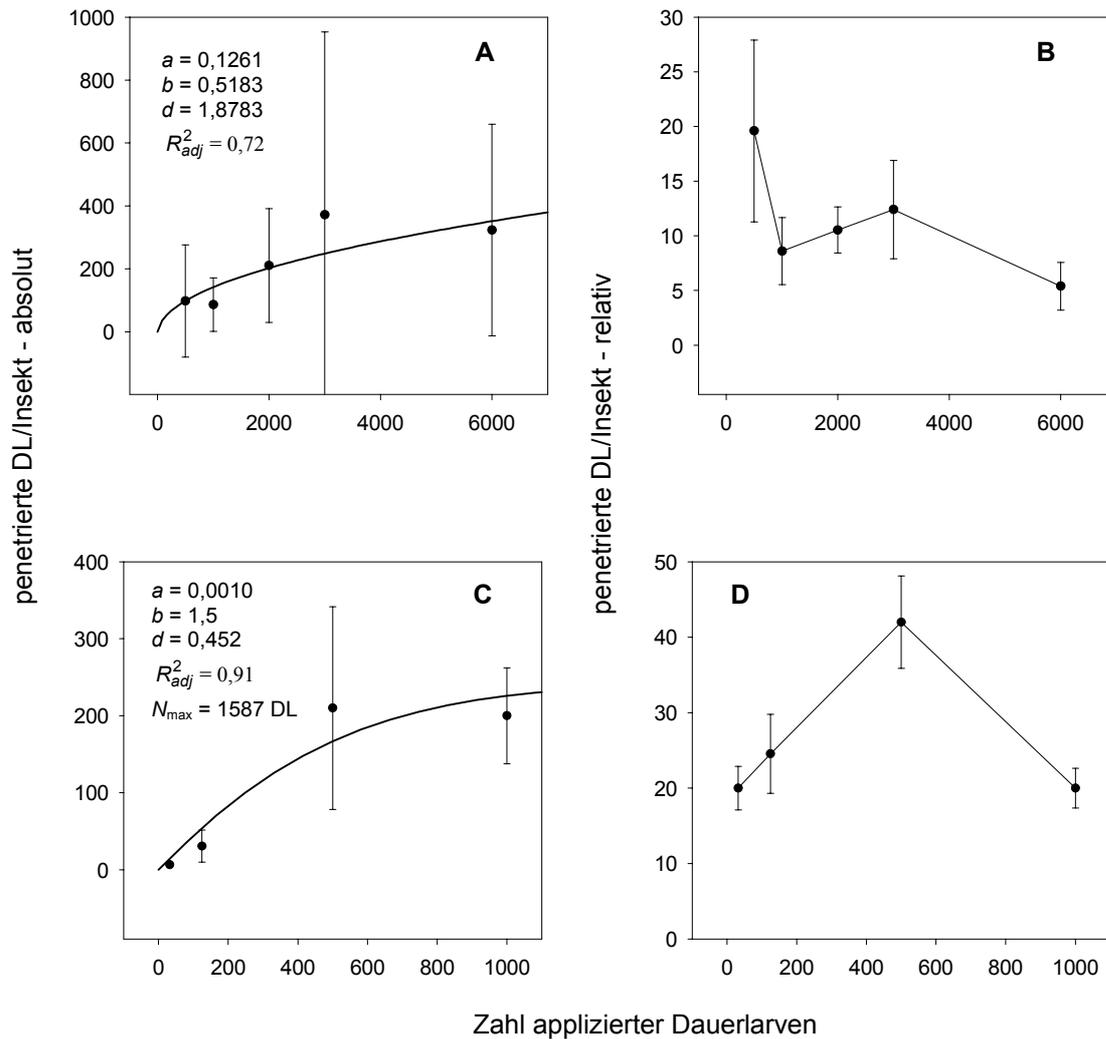


Abb. 3.31. Intraspezifische Konkurrenz für die Penetration von *H. bacteriophora* (A, B) und *S. glaseri* (C, D) in *M. melolontha*-L2-Larven im Testsystem I. **A., C.** Absolute Zahl der penetrierten Dauerlarven (DL) mit der angepassten Kurve nach Bellows (1981). Dargestellt sind die Mittelwerte und die jeweiligen 95% Konfidenzintervalle. **B., D.** Relative Zahl der penetrierten Dauerlarven in Prozent bezogen auf die Zahl applizierter Nematoden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit den jeweiligen Standardfehlern.

Demzufolge ist die eigentliche Konkurrenz unter den Nematoden im TS I vermindert durch die ungleiche (= aggregierte) Verteilung der Nematoden in den Larven (vgl. Abschnitt 3.4.5). Im TS II „stürzen“ die Nematoden sich dagegen auch bei hohen Dichten und damit größerer Konkurrenz auf das einzige zur Verfügung stehende Insekt; der Einfluss etwaiger Konkurrenzeffekte kann durch diese einseitigen Testbedingungen kompensiert werden. Bei *H. bacteriophora* legt der Verlauf der Kurve in Abb. 3.30 B jedoch nahe, dass selbst bei den höheren Nematoden-Dichten noch keine konkurrenzbedingte Verminderung der Penetrationsrate auftrat.

3.5 Selektion auf höhere Infektiosität

In der vorliegenden Arbeit wurden Selektionsexperimente mit entomopathogenen Nematoden durchgeführt. Bei den Versuchen erfolgte eine gerichtete Selektion der Nematoden auf höhere Infektiosität gegenüber Larven des Feldmaikäfers. Für jeden Selektionszyklus wurden jeweils nur die Nematoden verwendet, die eine Maikäferlarve erfolgreich infiziert und sich gut vermehrt hatten (Selektion über Wirtspassagen). Die Selektion erfolgte dabei bewusst in dem komplexeren *in vivo* System, um neben der eigentlichen Infektiosität weitere wichtige Faktoren, wie z.B. einer guten Vermehrung im Wirt, zu berücksichtigen. Ziel der Versuche war dabei weniger eine ausgearbeitete Selektionsstrategie (z.B. mit mehreren parallelen Zuchtlinien, Kreuzungen der einzelnen Linien und Rückkreuzungen usw.) anzuwenden, sondern vielmehr die Reaktion der Nematoden nach mehreren Wirtspassagen und die Grenzen der Selektion (Erreichen eines Selektionsplateaus, genetische Stabilität) zu untersuchen. Die Ergebnisse sollten als Grundlage für die Ausarbeitung geeigneter Selektionsstrategien dienen. Wichtige Aspekte hierzu lieferten auch die Versuche zur Befallsstrategie der Nematoden und deren Modellierung (vgl. Kapitel 3.3 und 3.4).

3.5.1 Selektionsverlauf, realisierte Heritabilität und phänotypische Korrelation

Die Selektion wurde mit den Nematodenarten *H. bacteriophora* und *S. glaseri* durchgeführt. Eine (nicht selektierte) Kontrollpopulation wurde während der Selektion wegen Knappheit des Tiermaterials (Larven des Maikäfers) nur teilweise mit untersucht.

Tab. 3.9. Die durchgeführten Selektionsversuche mit Angabe des verwendeten Nematoden-Stammes, der Selektionszyklen und der Dosierungen pro Zyklus. SL = Bezeichnung der Selektionslinie (H1-14 bedeutet dann z.B. *H.b.* HYB Selektionslinie H1 nach 14 Selektionszyklen).

		Dosierung = Zahl der applizierten Nematoden pro Zyklus														
		Selektionszyklus														
Nematoden-St.	SL	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>H.b.</i> HYB	H1	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³
	H2	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³											
	H3	10 ³	10 ³	10 ³	500	500										
<i>H.b.</i> PS7		10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³									
<i>H.b.</i> MB2		10 ³	10 ³	500	500											
<i>S.g.</i> NC	S1	10 ³	10 ³	500	250	125	63	63	63	32	32	32				
	S2	10 ³	10 ³	500	250	125	63	32	32	16	16	8	8-16	32	32	

Da die beiden untersuchten Nematodenarten beträchtlich unterschiedliche Infektiositäten gegenüber den Maikäfer-Larven zeigten, wurden die Selektionsparameter, vor allem die

Selektionsintensität (also die Remontierungsrate), während der Selektion entsprechend angepasst. Die Remontierung entspricht der Anzahl penetrierter Nematoden, die zur Vermehrung kamen, und lässt sich durch den Term αN_0 schätzen (siehe Kapitel 2.6).

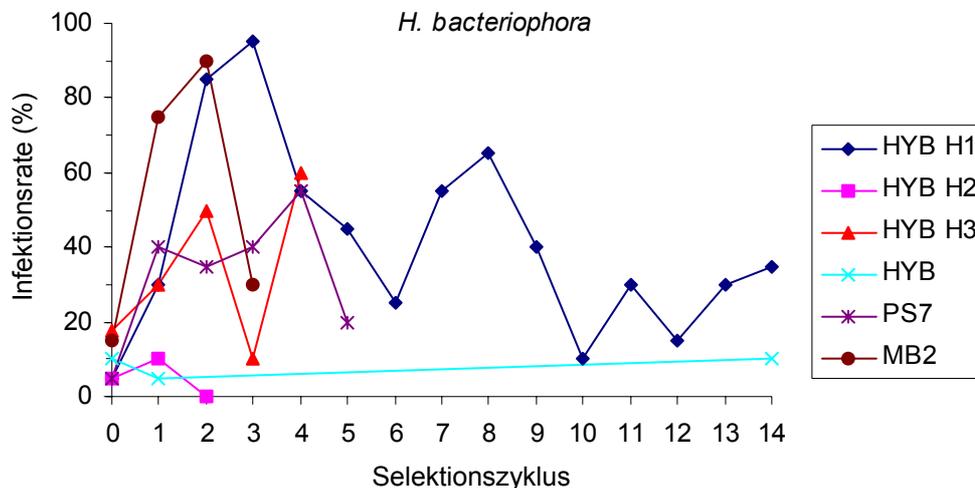


Abb. 3.32. Mortalität der *M. melolontha*-Larven (L3) während der Selektion von *H. bacteriophora* auf höhere Infektiosität über Wirtspassagen. Für die Linie H3 wurden ab dem 3. und für den Stamm MB2 ab dem 2. Selektionszyklus 500 Nematoden pro Larve appliziert, in allen übrigen Biotests wurden 1000 Nematoden appliziert (vgl. Tab. 3.9).

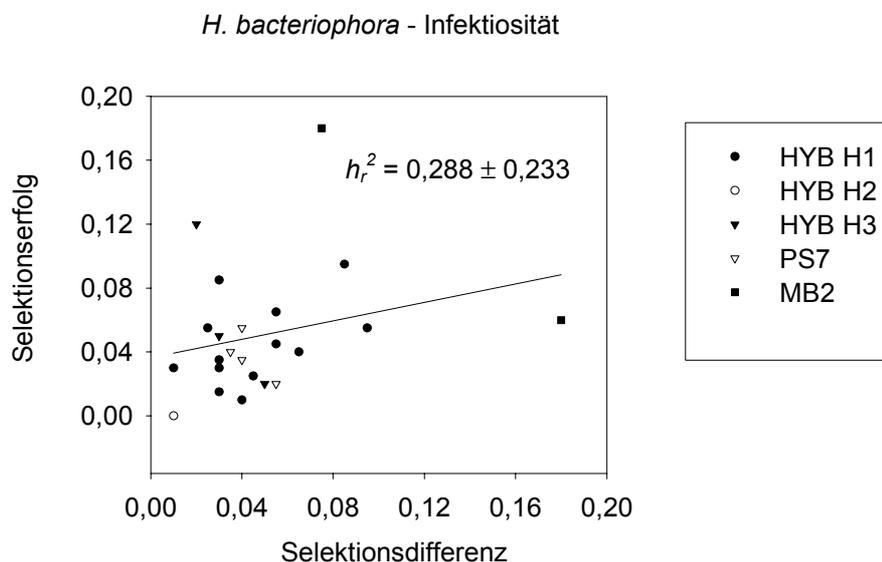


Abb. 3.33. Bestimmung der realisierten Heritabilität ($h_r^2 \pm s$) der Infektiosität von *H. bacteriophora* gegenüber *M. melolontha*-Larven (L3) bei der Selektion auf höhere Infektiosität über Wirtspassagen. Die Bestimmung erfolgte durch lineare Regression des kumulativen Selektionserfolgs über der kumulativen Selektionsdifferenz (jeweils angegeben als Infektionsrate pro DL = erreichte Mortalität in % geteilt durch die Anzahl applizierter Dauerlarven; vgl. Abschnitt 2.6.2). Es wurden alle 5 Wiederholungen mit den Stämmen HYB (Selektionslinien H1-3), PS7 und MB2 (jeweils eine Selektionslinie) zusammengefasst (vgl. Tab. 3.9 und Abb. 3.29). Der Wert für h_r^2 unterscheidet sich nicht signifikant von null (t -Test, $\alpha < 0,05$).

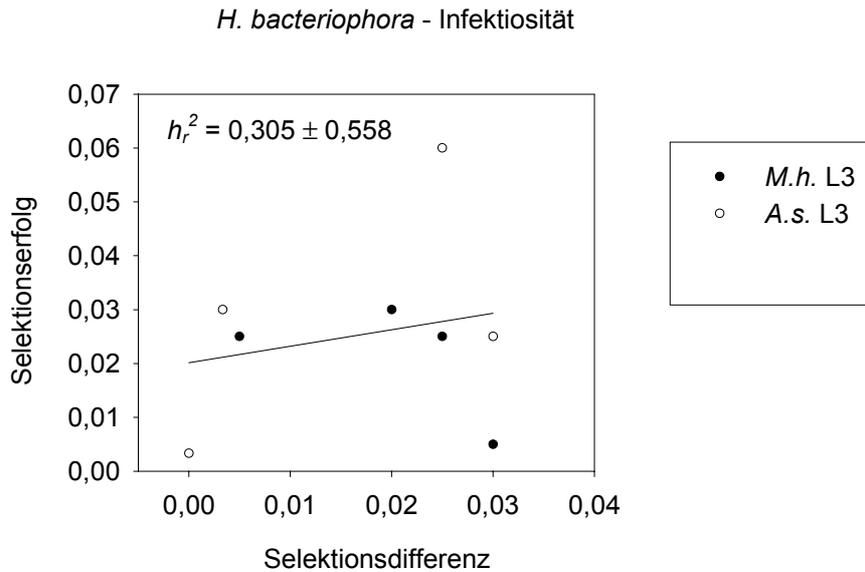


Abb. 3.34. Bestimmung der realisierten Heritabilität ($h_r^2 \pm s$) der Infektiosität von *H. bacteriophora* HYB (Selektionslinie H1) gegenüber *M. hippocastani*- und *A. solstitialis*-Larven (L3) bei der Selektion auf höhere Infektiosität über Wirtspassagen. Die Bestimmung erfolgte durch lineare Regression des kumulativen Selektionserfolgs über der kumulativen Selektionsdifferenz (jeweils angegeben als Infektionsrate pro DL = erreichte Mortalität in % geteilt durch die Anzahl applizierter Dauerlarven; vgl. Abschnitt 2.6.2). Die Vermehrung der Nematoden erfolgte stets in *M. melolontha*-Larven (L3) (vgl. Abb. 3.32). Der Wert für h_r^2 unterscheidet sich nicht signifikant von null (t -Test, $\alpha < 0,05$).

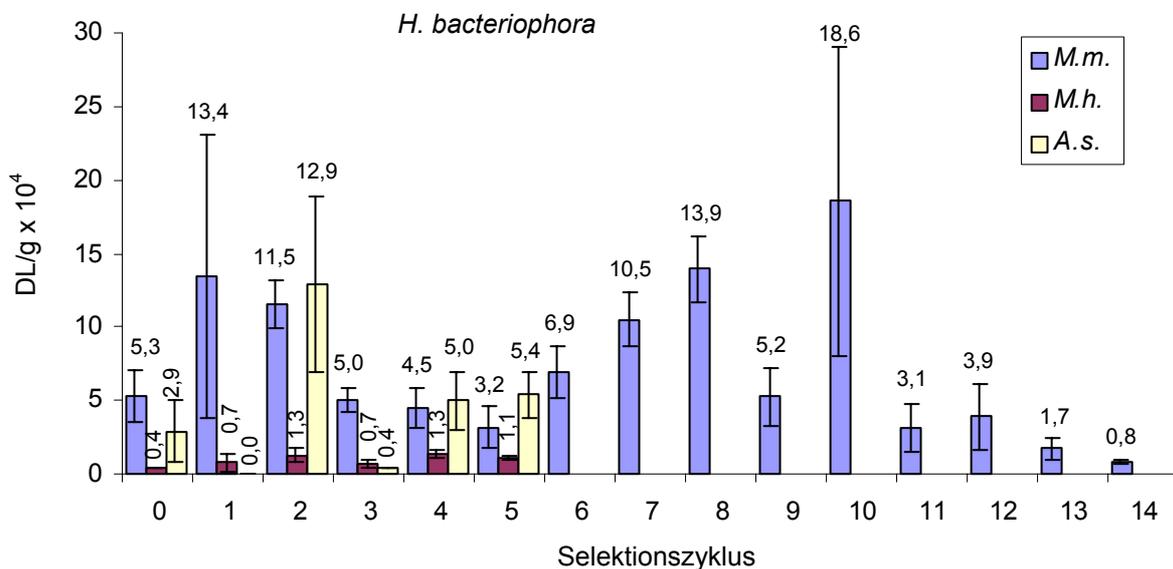


Abb. 3.35. Mittleres Vermehrungspotential und Standardfehler für den Nematoden *H. bacteriophora* HYB (Selektionslinie H1) in Larven von *M. melolontha*, *M. hippocastani*, *A. solstitialis* (alles L3-Larven) während der Selektion auf höhere Infektiosität über Wirtspassagen. Die Nematoden für den nächsten Zyklus wurden stets in *M. melolontha*-Larven vermehrt.

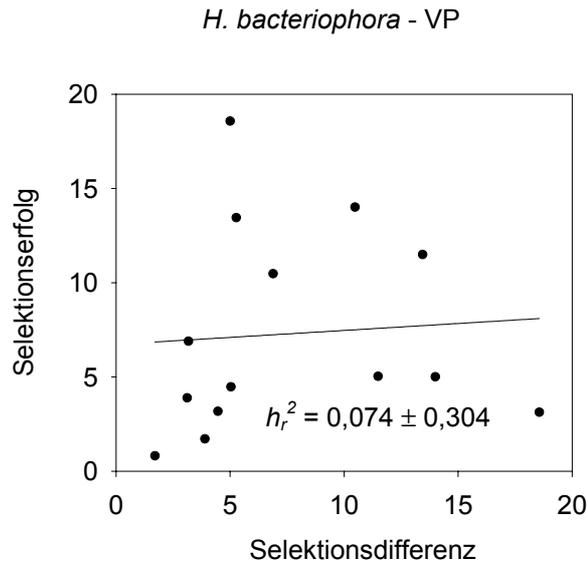


Abb. 3.36. Bestimmung der realisierten Heritabilität ($h_r^2 \pm s$) des Vermehrungspotentials von *H. bacteriophora* HYB (Selektionslinie H1) in *M. melolontha*-Larven (L3) bei der Selektion auf höhere Infektiosität über Wirtspassagen. Die Bestimmung erfolgte durch lineare Regression des kumulativen Selektionserfolgs über der kumulativen Selektionsdifferenz (jeweils angegeben als Dauerlarven pro g Lebendgewicht der *M.m.*-L3-Larven; vgl. Abschnitt 2.6.2). Der Wert für h_r^2 unterscheidet sich nicht signifikant von null (t -Test, $\alpha < 0,05$).

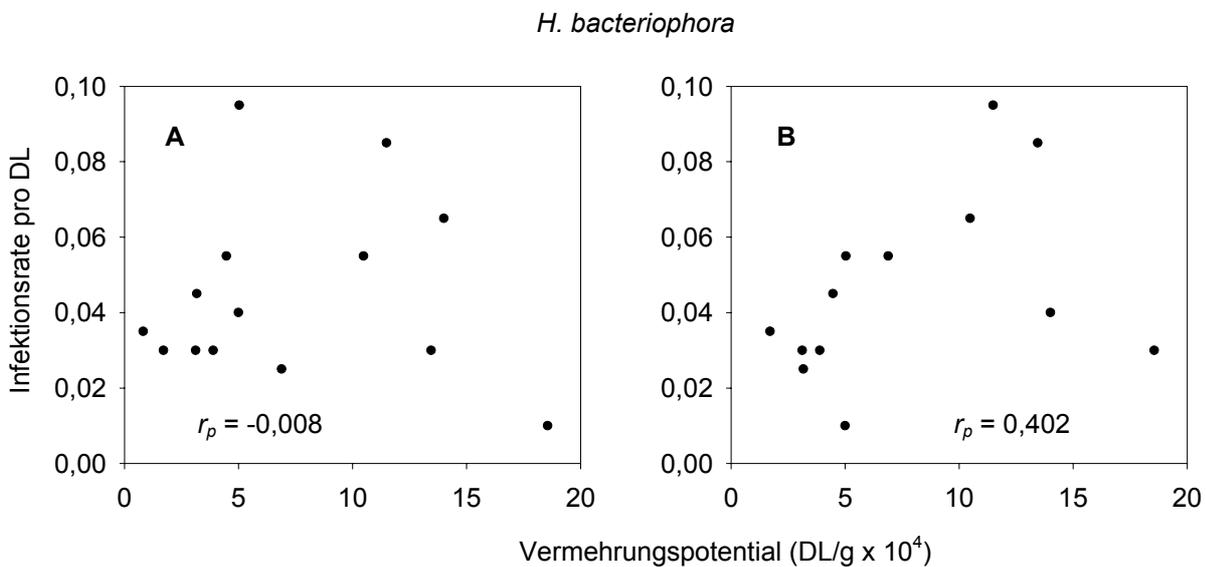


Abb. 3.37. Phänotypische Korrelation der Merkmale „Infektiosität“ und „Vermehrungspotential“ während der Selektion auf höhere Infektiosität gegen *M. melolontha*-Larven über Wirtspassagen bei *H. bacteriophora* HYB (Selektionslinie H1). **A.** Die beiden Merkmale innerhalb der gleichen Generation (x). **B.** Das Vermehrungspotential der ($x-1$)-ten Generation und die Infektiosität der x -ten Generation. Beide Korrelationen sind nicht signifikant (F-Test, $\alpha < 0,05$). r_p = phänotypischer Korrelationskoeffizient.

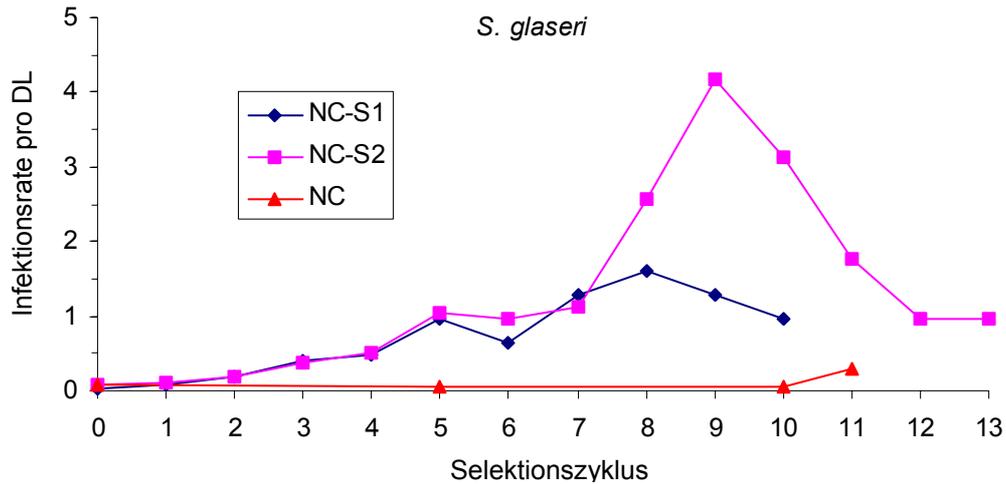


Abb. 3.38. Infektiosität von *S. glaseri* NC gegenüber *M. melolontha*-Larven (L3) während der Selektion auf höhere Infektiosität über Wirtspassagen. Angegeben ist die Infektionsrate pro Dauerlarve (= erreichte Mortalität in % dividiert durch die Anzahl applizierter Dauerlarven), da die Anzahl der applizierten Dauerlarven variierte (vgl. Tab. 3.9). S1 und S2 kennzeichnen die zwei unabhängigen Wiederholungen der Selektion. DL = Dauerlarve.

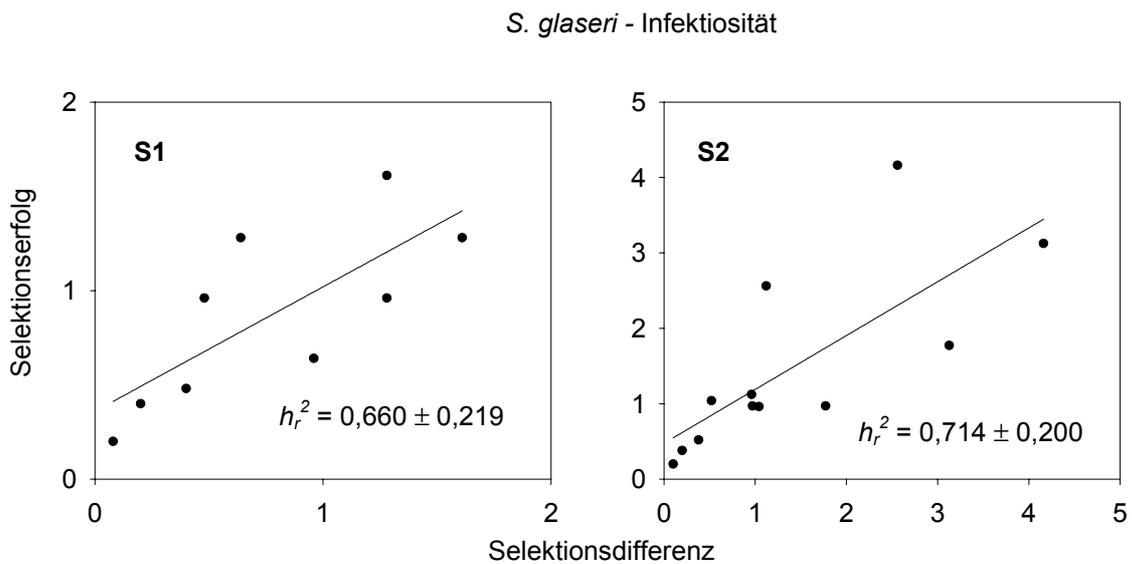


Abb. 3.39. Bestimmung der realisierten Heritabilität ($h_r^2 \pm s$) der Infektiosität von *S. glaseri* NC gegenüber *M. melolontha*-Larven (L3) bei der Selektion auf höhere Infektiosität über Wirtspassagen. Die Bestimmung erfolgte durch lineare Regression des kumulativen Selektionserfolgs über der kumulativen Selektionsdifferenz (jeweils angegeben als Infektionsrate pro DL = erreichte Mortalität in % geteilt durch die Anzahl applizierter Dauerlarven; vgl. Abschnitt 2.6.2). S1 und S2 kennzeichnen die zwei unabhängigen Wiederholungen der Selektion. Der Werte für h_r^2 unterscheiden sich signifikant von null (t -Test, $\alpha < 0,05$).

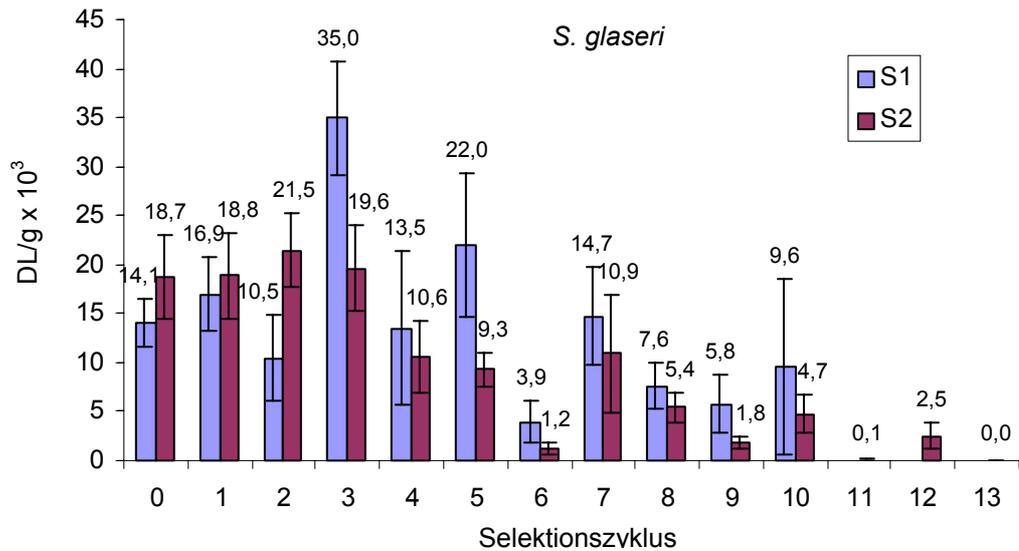


Abb. 3.40. Mittleres Vermehrungspotential und Standardfehler für den Nematoden *S. glaseri* NC in *M. melolontha*-Larven (L3) während der Selektion auf höhere Infektiosität über Wirtspassagen. S1 und S2 kennzeichnen die zwei unabhängigen Wiederholungen der Selektion.

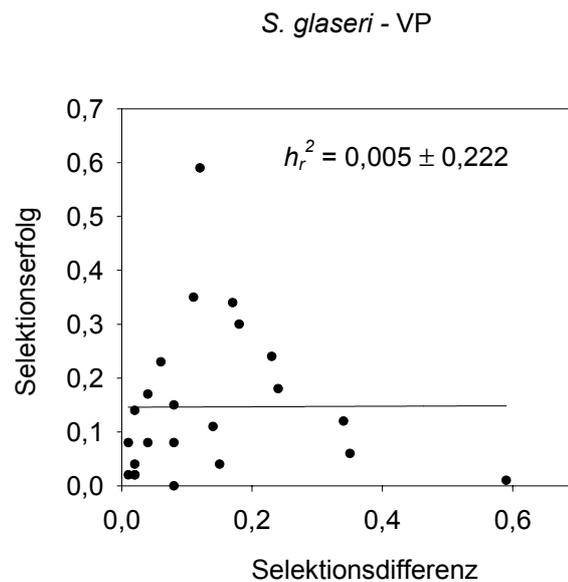


Abb. 3.41. Bestimmung der realisierten Heritabilität ($h_r^2 \pm s$) des Vermehrungspotentials von *S. glaseri* NC (Selektionslinien S1 und S2 zusammengefasst) in *M. melolontha*-Larven (L3) bei der Selektion auf höhere Infektiosität über Wirtspassagen. Die Bestimmung erfolgte durch lineare Regression des kumulativen Selektionserfolgs über der kumulativen Selektionsdifferenz (jeweils angegeben als Dauerlarven pro g Lebendgewicht der *M.m.*-L3-Larven dividiert durch die Anzahl applizierter Dauerlarven; vgl. Abschnitt 2.6.2). Der Wert für h_r^2 unterscheidet sich nicht signifikant von null (t -Test, $\alpha < 0,05$).

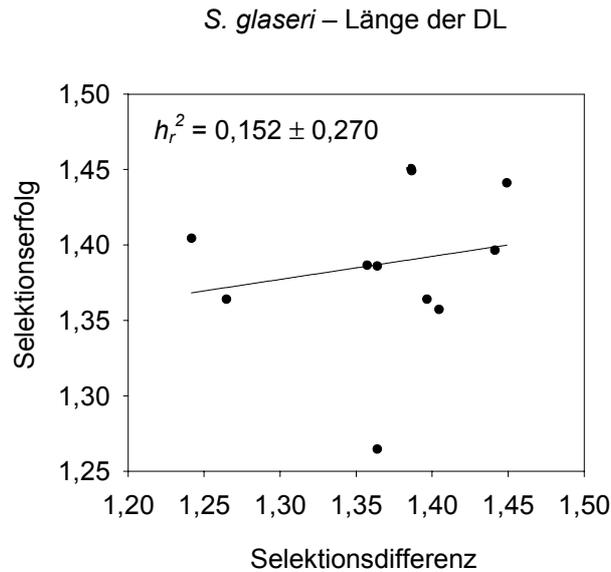


Abb. 3.42. Bestimmung der realisierten Heritabilität ($h_r^2 \pm s$) der Länge der Dauerlarven von *S. glaseri* NC (Selektionslinien S1 und S2 zusammengefasst) in *M. melolontha*-Larven (L3) bei der Selektion auf höhere Infektiosität über Wirtspassagen. Die Bestimmung erfolgte durch lineare Regression des kumulativen Selektionserfolgs über der kumulativen Selektionsdifferenz (jeweils angegeben als mittlere Länge der Dauerlarven in mm; vgl. Abschnitt 2.6.2). Der Wert für h_r^2 unterscheidet sich nicht signifikant von null (t -Test, $\alpha < 0,05$).

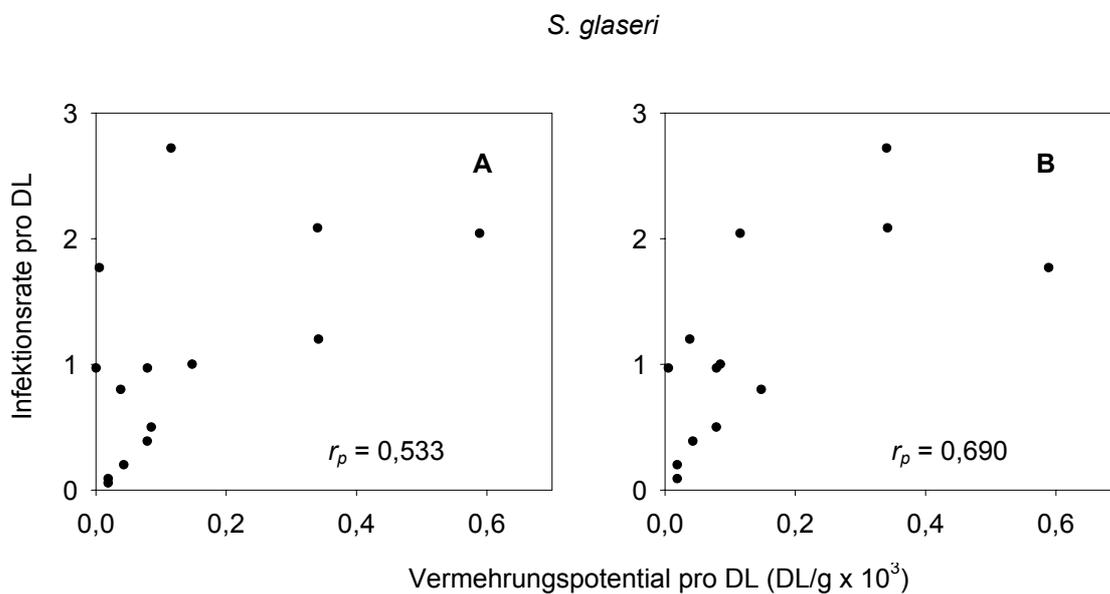


Abb. 3.43. Phänotypische Korrelation der Merkmale „Infektiosität“ und „Vermehrungspotential“ (angegeben als Dauerlarven pro g Lebendgewicht der *M.m.*-L3-Larven dividiert durch die Anzahl applizierter Dauerlarven) während der Selektion auf höhere Infektiosität gegen *M. melolontha*-Larven über Wirtspassagen bei *S. glaseri* NC (Selektionslinien S1 und S2 zusammengefasst). **A.** Die beiden Merkmale innerhalb der gleichen Generation (x). **B.** Das Vermehrungspotential der ($x-1$)-ten Generation und die Infektiosität der x -ten Generation. Beide Korrelationen sind signifikant (F-Test, $\alpha < 0,05$). r_p = phänotypischer Korrelationskoeffizient.

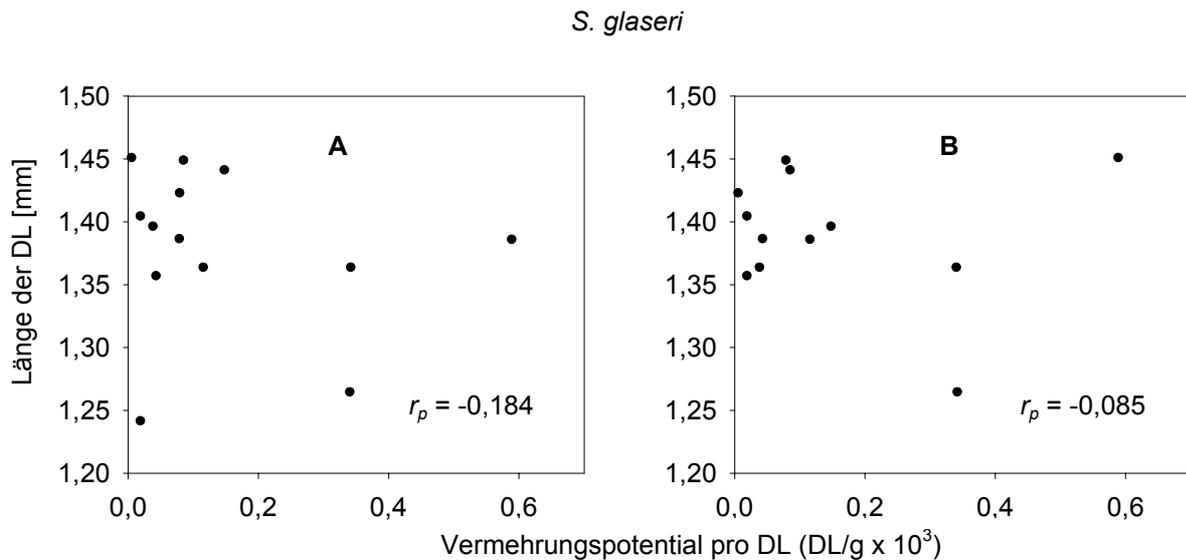


Abb. 3.44. Phänotypische Korrelation der Merkmale „Länge“ und „Vermehrungspotential“ (angegeben als Dauerlarven pro g Lebendgewicht der *M.m.*-L3-Larven dividiert durch die Anzahl applizierter Dauerlarven) während der Selektion auf höhere Infektiosität gegen *M. melolontha*-Larven über Wirtspassagen bei *S. glaseri* NC (Selektionslinien S1 und S2 zusammengefasst). **A.** Die beiden Merkmale innerhalb der gleichen Generation (x). **B.** Das Vermehrungspotential der ($x-1$)-ten Generation und die Länge der x -ten Generation. Beide Korrelationen sind nicht signifikant (F-Test, $\alpha < 0,05$). r_p = phänotypischer Korrelationskoeffizient.

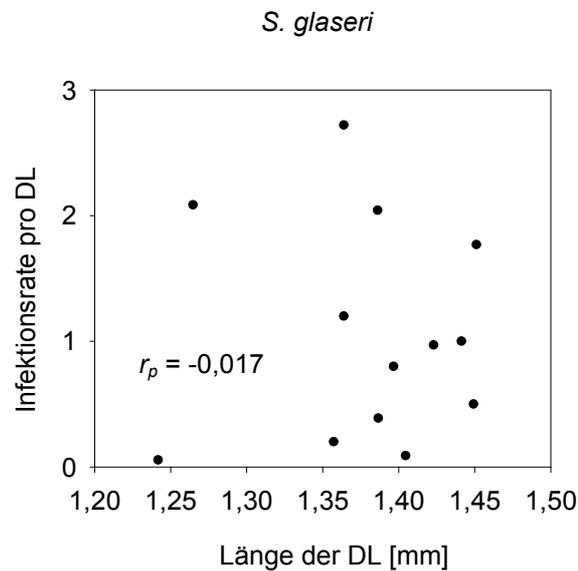


Abb. 3.45. Phänotypische Korrelation der Merkmale „Infektiosität“ und „Länge“ während der Selektion auf höhere Infektiosität gegen *M. melolontha*-Larven über Wirtspassagen bei *S. glaseri* NC (Selektionslinien S1 und S2 zusammengefasst). Die Korrelation ist nicht signifikant (F-Test, $\alpha < 0,05$). r_p = phänotypischer Korrelationskoeffizient.

Die aus der Selektion auf höhere Infektiosität gegen *M. melolontha*-Larven (L3) ermittelte realisierte Heritabilität liegt für *H. bacteriophora* im Bereich von 0,3, unterscheidet sich

jedoch nicht signifikant von null (Abb. 3.33 und 3.34). Die Werte für *S. glaseri* liegen dagegen bei 0,7 und sind signifikant von null verschieden (Abb. 3.39).

Bei *H. bacteriophora* war die Infektiosität zwischen den Selektionszyklen durch große Schwankungen geprägt (Abb. 3.32). Die Anzahl applizierter Nematoden (= Dosis) wurde nicht reduziert, da die Vermehrung der Nematoden für den nächsten Zyklus gesichert bleiben sollte, zumal der Vermehrungserfolg in *M. melolontha*-Larven selbst großen Schwankungen unterlag (Abb. 3.35, Abschnitt 3.4.4). Im Diskussionsteil müssen daher vor allem die Gründe für diese Schwankungen unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Versuche zur Infektionsbiologie eingehend betrachtet werden.

Innerhalb der ersten drei Selektionszyklen wurden bei *H. bacteriophora* die größten Selektionserfolge erzielt. Bei allen fünf Wiederholungen der Selektion fiel auf, dass der größte Selektionserfolg im ersten Zyklus erreicht wurde (Abb. 3.32). Der Mittelwert des Faktors des Selektionserfolgs zwischen der 0-ten und der 1-ten Generation beträgt $3,9 \pm 1,2$ ($n = 5$) und ist damit signifikant größer als der Faktor zwischen allen folgenden Generationen ($1,4 \pm 0,3$; $n = 23$; t -Test, $\alpha < 0,05$). Vom 0-ten (= Ausgangspopulation) zum 1-ten Zyklus fand ein Wirtswechsel statt: die Ausgangspopulation wurde in *Galleria*-Larven, die Population des 1-ten Zyklus (wie alle folgenden) in *M. melolontha*-Larven vermehrt. Für die Regressionsanalyse wurde daher die 0-te Generation nicht berücksichtigt. Der Vermehrungswirt (*G. mellonella* im Vergleich zu *M. melolontha*) der Nematoden wirkt sich demnach auf deren Wirksamkeit aus. Eine LD_{50} -Bestimmung mit Nematoden der Selektionslinie H1-14, die nach einer Zwischenvermehrung in *Galleria*-Larven erneut in Larven von *M. melolontha* vermehrt wurden, bestätigte diesen Befund: Die relative Wirkung war um den Faktor 5-6 höher (signifikant) als bei Nematoden, die sich in *Galleria*-Larven vermehrt hatten (vgl. Abschnitt 3.3.1, Tab. 3.2).

Die LD_{50} -Bestimmungen bei Nematoden, die in *Galleria*-Larven vermehrt wurden, ließen dagegen keinen Unterschied zwischen dem Ausgangsstamm der Selektion (HYB) und der Selektionslinie H1-14 erkennen. Lediglich bei L2-Larven konnte eine etwas erhöhte Wirksamkeit der Selektionslinie beobachtet werden (nicht signifikant; Abschnitt 3.3.1). Folglich konnte für *H. bacteriophora* durch die Selektion über Wirtspassagen keine oder eine nur sehr geringe Steigerung der Infektiosität erreicht werden. Umweltbedingte Einflüsse (Qualität der Nematoden-Charge, Zustand der Insektenlarven) auf die Wirksamkeit und deren mögliche physiologische Ursachen werden im Diskussionsteil besprochen (Kapitel 4.5).

Bei *S. glaseri* konnte aufgrund geringerer Schwankungen der Wirksamkeit zwischen den Selektionszyklen (Abb. 3.38) und der höheren Infektiosität die Selektionsintensität

systematisch erhöht werden, indem die Anzahl applizierter Nematoden ab dem zweiten Selektionszyklus sukzessive vermindert wurde (vgl. Tab. 3.9).

In den ersten drei Zyklen wurde der Selektionserfolg bei *S. glaseri* wahrscheinlich unterschätzt, da die Mortalität mehrfach 100% betrug (Daten nicht dargestellt). Diese Unterschätzung kann daher auch zu einer (geringfügigen) Unterschätzung der realisierten Heritabilität geführt haben.

Auch bei *S. glaseri* konnte ein Einfluss des Vermehrungswirts der Nematoden auf deren Wirksamkeit beobachtet werden: Die Vermehrung der Nematoden des Ausgangsstammes (NC) in *M. melolontha*-Larven steigerte deren relative Wirkung um den Faktor 10-12 und damit auf das Niveau der Selektionslinie S2-10 (vgl. Abschnitt 3.3.1, Tab. 3.2). Für die Selektionslinie S2-10 war dagegen kein Unterschied feststellbar. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis auf die genetische Fixierung des Merkmals „höhere Infektiosität“ bei der Selektionslinie. Eine weitere Besprechung dieser Aspekte erfolgt im Diskussionsteil.

Der Mortalitätsverlauf in den Biotests während der Selektion zeigt bei *S. glaseri* mit abnehmender Zahl applizierter Nematoden einen flacheren Verlauf, d.h. die Wirkung trat verzögert auf (Daten nicht dargestellt). Dies beweist, dass die Geschwindigkeit der Infektion eine Funktion der Nematoden-Dichte ist.

Der Verlauf der Selektionsfortschritte zeigt, dass ab dem 8. bzw. 9. Selektionszyklus kein weiterer Selektionsfortschritt erzielt werden konnte (Abb. 3.38). Es war offenbar ein Selektionsplateau erreicht.

Das abnehmende Vermehrungspotential (Abb. 3.40) und das Ausbleiben weiterer Selektionsfortschritte verdeutlicht, dass im Bereich von 16-32 applizierten Nematoden pro *M. melolontha*-Larve ein Grenzbereich für die Selektionsintensität erreicht ist.

In einem weiteren Versuch konnte die Abhängigkeit des Vermehrungspotentials von der Zahl der applizierten Nematoden belegt werden (Abschnitt 3.5.2, Abb. 3.48). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die selektierten Nematoden im Vergleich zum Ausgangsstamm tendenziell ein geringeres Vermehrungspotential besitzen (Abschnitt 3.5.2, Abb. 3.49).

Auch für *H. bacteriophora* ging das Vermehrungspotential von Zyklus zu Zyklus mit starken Schwankungen und einem Trend zur Verringerung einher (Abb. 3.35).

Die realisierte Heritabilität des Vermehrungspotentials ist sehr klein bzw. nahezu null ($\ll 0,1$; Abb. 3.36 und 3.41). Die hohen Schwankungen von Zyklus zu Zyklus deuten darauf hin, dass das Vermehrungspotential in erster Linie von umweltbedingten Faktoren abhängt.

Die Länge der Dauerlarven nahm bei *S. glaseri* während der ersten Selektionszyklen um etwa 20% zu und stabilisierte sich dann auf diesem Niveau (Tab. 3.10). Für die Länge der Dauerlarven wurde eine sehr kleine realisierte Heritabilität von etwa 0,15 (nicht signifikant

von null verschieden) ermittelt (Abb. 3.42). Die Länge der Dauerlarven ist also ebenfalls in erster Linie von Umweltfaktoren abhängig (vgl. Abschnitt 3.5.2). Die Selektion auf höhere Infektiosität über 10 Selektionszyklen führte jedoch offensichtlich zu einer genetischen Fixierung der Anlagen für längere Dauerlarven, da die Länge der Dauerlarven auch nach 7 Generationen ohne Selektionsdruck signifikant über der Länge der Dauerlarven der Ausgangspopulation lag (Abschnitt 3.5.2, Tab. 3.10).

Die Bestimmung des phänotypischen Korrelationskoeffizienten für die Merkmale „Infektiosität“ und „Vermehrungspotential“ ergab für beide Nematodenarten einen größeren Wert (etwa 0,4 für *H. bacteriophora* und 0,7 für *S. glaseri*), wenn das Vermehrungspotential der ($x-1$)-ten Generation berücksichtigt wurde (Abb. 3.37 und 3.43). Die aus der Vermehrung der ($x-1$)-ten Generation resultierenden Nematoden entsprechen der applizierten Nematoden-Charge (x), d.h. das Vermehrungspotential der vorausgehenden Generation kann als Maß für die Güte (Qualität) der applizierten Nematoden angesehen werden: gute Vermehrung lässt auf hohe Qualität = Infektiosität schließen.

Der Korrelationskoeffizient zwischen der Infektiosität und dem Vermehrungspotential der gleichen Generation (= der applizierten Nematoden) ist geringer (für *H. bacteriophora* nahezu 0, für *S. glaseri* etwa 0,5), d.h. eine hohe Infektionsrate lässt weniger stark bzw. nicht, wie bei der ($x-1$)-ten Generation, auf ein hohes Vermehrungspotential schließen. Dieser Befund deutet erneut darauf hin, dass das Vermehrungspotential in hohem Maß von „äußeren“ Faktoren beeinflusst wird. Bei *S. glaseri* sind die Korrelationen im Gegensatz zu *H. bacteriophora* sowohl für die x -te als auch für die ($x-1$)-te Generation signifikant (Abb. 3.43). Dieser Unterschied lässt sich so interpretieren, dass bei *H. bacteriophora* die Vermehrung bzw. das Vermehrungspotential in *M. melolontha*-Larven weniger stark von der Qualität der applizierten Nematoden vorbestimmt wird, sondern in höherem Ausmaß als bei *S. glaseri* von äußeren Faktoren, z.B. dem Zustand der Larve, abhängt.

Die Bestimmung des phänotypischen Korrelationskoeffizienten zwischen den Merkmalen „Länge“ und „Vermehrungspotential“ für *S. glaseri* ergab einen Wert von etwa $-0,2$, wenn das Vermehrungspotential der ($x-1$)-ten Generation berücksichtigt wurde und etwa $-0,08$ für die x -te Generation (Abb. 3.44). Ein hohes Vermehrungspotential führte also zu kleineren Dauerlarven. Die Abhängigkeit der Länge der Dauerlarven von der Anzahl applizierter Nematoden und dem Vermehrungspotential wurde in separaten Versuchen untersucht (Abschnitt 3.5.2).

Der phänotypische Korrelation zwischen den Merkmalen „Länge“ und „Infektiosität“ bei *S. glaseri* ist nahezu null, d.h. die Länge der Dauerlarven lässt keine Rückschlüsse auf deren Infektiosität zu (Abb. 3.45).

3.5.2 Merkmale des Nematoden-Bakterien-Komplexes während der Selektion

Virulenz der symbiotischen Bakterien

In diesem Versuch sollte geprüft werden, ob die Virulenz der symbiotischen Bakterien der Nematoden während der Selektion unverändert bleibt. Für eine LD₅₀-Bestimmung reichte das Tiermaterial nicht aus, so dass für jede Bakterienart jeweils nur eine Dosis getestet wurde. Die Bakterien wurden in das Hämocoel der *M. melolontha*-L3-Larven injiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.46 dargestellt.

Es konnte für beide Nematodenarten kein signifikanter Unterschied in der Wirkung zwischen den Bakterien des Ausgangsstammes und der Selektionslinie festgestellt werden. Auch die Mortalitäten der entsprechenden Dosierungen der Bakterien des Ausgangsstammes bei den LD₅₀-Bestimmungen (vgl. Abschnitt 3.3.3) unterscheiden sich bei beiden Nematodenarten nicht signifikant zu den hier ermittelten Werten (Chi-Quadrat-Test, $\alpha < 0,05$).

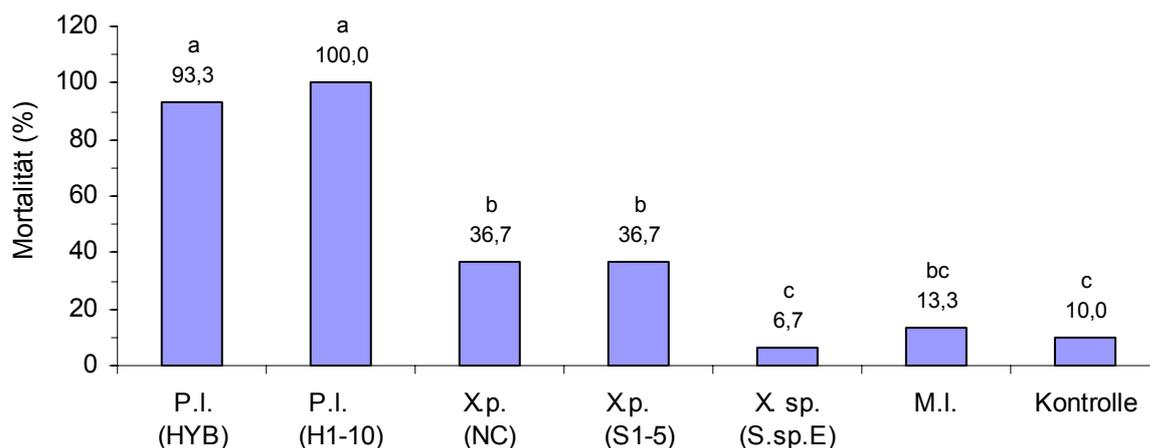


Abb. 3.46. Mortalität von *M. melolontha*-L3-Larven ($n = 30$) acht Tage nach hämocoelarer Injektion von jeweils 1000 Bakterienzellen, die aus dem Ausgangsstamm oder einer Selektionslinie (jeweils in Klammern angegeben) von *H. bacteriophora* (HYB) bzw. *S. glaseri* (NC) isoliert wurden. Werte, die mit mindestens einem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Chi-Quadrat-Test, $\alpha < 0,05$). Bei der Kontrolle wurde sterile Insekten-Ringerlösung injiziert. P.I. = *Photorhabdus luminescens*; X.p. = *Xenorhabdus poinarii*; X.sp. = *Xenorhabdus* sp.; M.I. = *Micrococcus luteus*.

Fettdepot der Dauerlarven

Dauerlarven der Nematoden nehmen keine Nahrung auf und sind daher auf eingelagerte Nahrungsreserven angewiesen. Die wichtigste Nahrungsreserve stellen die eingelagerten Lipide dar. Da ein Einfluss des Vermehrungswirts auf die Wirksamkeit der Nematoden festgestellt wurde (vgl. Abschnitt 3.3.1), sollte untersucht werden, ob auch ein Einfluss auf den Umfang des angelegten Fettdepots der Dauerlarven feststellbar ist. Bei der Art *S. glaseri* ergab sich zusätzlich die Frage, ob die Längenzunahme der Dauerlarven während der

Selektion eine Vergrößerung des angelegten Fettdepots mit sich bringt. Zur Abschätzung des Fettdepots wurde der Triglyceridgehalt der Dauerlarven ermittelt. Triacylglycerine machen den größten Anteil der eingelagerten Lipide bei EPN aus. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.47 zusammenfassend dargestellt.

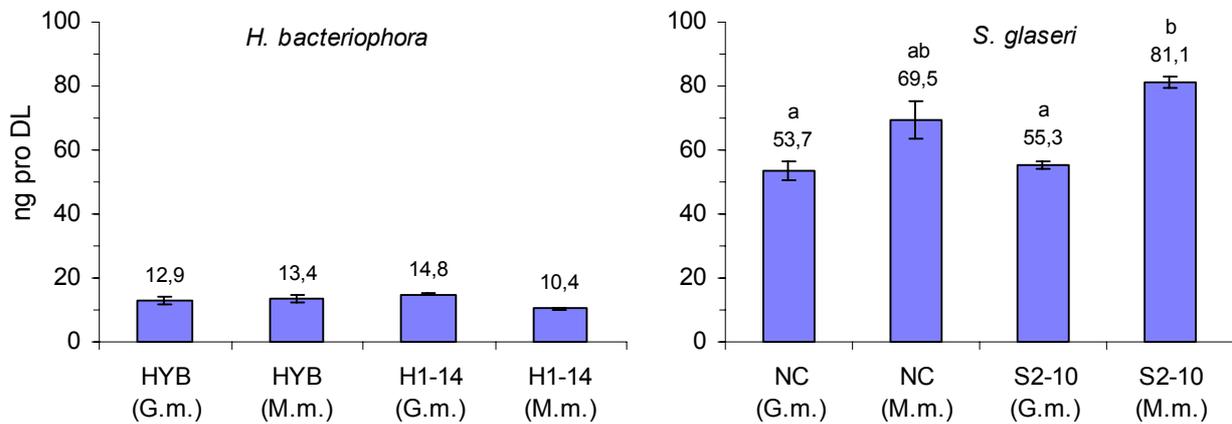


Abb. 3.47. Triglyceridgehalt pro Dauerlarve [ng] mit Standardfehler für die Ausgangsstämme und die Selektionslinien von *H. bacteriophora* (HYB) und *S. glaseri* (NC) in Abhängigkeit vom Vermehrungswirt. Angegeben ist der Mittelwert aus drei Wiederholungen. Der jeweilige Vermehrungswirt (*M. melolontha*-Larven oder *Galleria*-Larven) ist in Klammern angegeben. Die Werte wurden innerhalb einer Nematodenart auf Signifikanz geprüft. Werte, die mit mindestens einem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Tukey-Test, $\alpha < 0,05$). DL = Dauerlarve.

Länge der Dauerlarven

Während der Selektion auf höhere Infektiosität wurde bei *S. glaseri* eine deutliche Längenzunahme der Dauerlarven beobachtet. Zur Überprüfung, ob diese Zunahme physiologisch oder genetisch bedingt ist, wurde die Länge der Dauerlarven nach jedem Selektionszyklus, in Abhängigkeit vom Vermehrungswirt und bei mehreren Vermehrungszyklen in *Galleria*-Larven ohne Selektionsdruck gemessen (Tab. 3.10). Die Längenmessung der Nematoden erfolgte mit Hilfe eines Objektmikrometers (Zeiss, 2 mm mit 200 Unterteilungen) bei 40-50facher Vergrößerung (Durchlicht). Für jede Nematodenpopulation wurden 40-120 zufällig ausgewählte Nematoden vermessen. Um die zu vermessenden Nematoden abzutöten, so dass sie in gestreckter Form vorliegen, wurde die Nematodensuspension (etwa 100 μ l) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für 2 min in einer Mikrowelle (AEG bei 100%) erhitzt.

Die Variabilität der Länge der Dauerlarven in der Art *S. glaseri* wurde durch Vergleich der drei verfügbaren Stämme dieser Art sowie einer Rückkreuzung einer Selektionslinie (S2-10) mit dem Ausgangsstamm (NC) und zwischen zwei Stämmen (NC x NJH) ermittelt.

Bei der Art *H. bacteriophora* (HYB) waren die Dauerlarven nach 14 Selektionszyklen in *M. melolontha*-Larven (L3) geringfügig, aber signifikant kleiner als der Ausgangsstamm. In Abhängigkeit vom Vermehrungswirt wurde kein Unterschied in der Länge der Dauerlarven festgestellt (Tab. 3.11).

Tab. 3.10. Mittlere Länge der Dauerlarven von *S. glaseri* [mm] während der Selektion in Abhängigkeit vom Vermehrungswirt (VW) und nach einigen Vermehrungszyklen ohne Selektionsdruck (= Vermehrung in *Galleria*-Larven). SZ = Selektionszyklus (= Anzahl Vermehrungszyklen in *M.m.*-Larven); S1/S2 = Selektionslinien. Werte, die mit mindestens einem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Kruskal-Wallis-Test, Methode nach Dunn, $\alpha < 0,05$).

VW SZ	<i>S. glaseri</i> -Stamm/Linie					<i>S.g.</i> -Kreuzungen	
	NC-S1/S2	NC	NC-S2-10	RS92	NJH	NC x S2-10	NC x NJH
	<i>M.m.</i>	<i>G.m.</i>	<i>G.m.</i>	<i>G.m.</i>	<i>G.m.</i>	<i>G.m.</i>	<i>G.m.</i>
0		1,159 ± 0,012 ab		1,081 ± 0,012 a	1,569 ± 0,019 ef	1,332 ± 0,008 b	1,628 ± 0,018 f
1	1,242 ± 0,011 ab	1,204 ± 0,012 ab ¹	1,458 ± 0,012 cdef				
2	1,405 ± 0,017 cd	1,357 ± 0,013 c ¹	1,497 ± 0,011 def				
3	1,357 ± 0,018 c		1,409 ± 0,015 cd				
4	1,387 ± 0,020 c		1,427 ± 0,012 cdef				
5	1,449 ± 0,015 cdef		1,229 ± 0,011 ab				
6	1,441 ± 0,017 cdef		1,418 ± 0,010 cde				
7	1,397 ± 0,014 cd		1,421 ± 0,012 cde				
8	1,253 ± 0,008 b						
9	1,364 ± 0,011 c						
10	1,386 ± 0,009 c	1,458 ± 0,012 cdef ¹					
11	1,451 ± 0,009 cdef						
12	1,423 ± 0,013 cde						

¹ Der Ausgangsstamm NC wurde 1 x, 2 x bzw. 3 x in *M.m.*-Larven vermehrt, dann 1 x in *Galleria*-Larven

Tab. 3.11. Mittlere Länge der Dauerlarven von *H. bacteriophora* (HYB) [mm] nach 14 Selektionszyklen (Selektionslinie H1) und in Abhängigkeit vom Vermehrungswirt. Werte, die mit mindestens einem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Tukey-Test, $p < 0,05$). SZ = Selektionszyklus; VW = Vermehrungswirt.

VW SZ	<i>H. bacteriophora</i> HYB	
	<i>M.m.</i>	<i>G.m.</i>
0	0,617 ± 0,005 bc	0,625 ± 0,004 c
14	0,598 ± 0,003 a	0,604 ± 0,004 ab

Vermehrungspotential

In diesen Versuchen sollte überprüft werden, ob sich das Vermehrungspotential der Selektionslinien von dem der Ausgangsstämme unterscheidet (Abb. 3.49). Das Vermehrungspotential wurde dabei auch in Abhängigkeit von der Nematoden-Dichte untersucht (Abb. 3.48). Für *H. bacteriophora* schlugen diese Versuche fehl, da es in keiner der infizierten *M. melolontha*-Larven (n = 34) zu einer erfolgreichen Vermehrung der Nematoden kam. Die infizierten Larven hatten jedoch alle eine typisch dunkelrote Verfärbung, so dass angenommen werden kann, dass die Larven von *H. bacteriophora* befallen und getötet wurden. Die Ursachen für das Ausbleiben der Vermehrung blieben unklar. Hohe Schwankungen des Vermehrungspotentials bzw. ein unsicherer Vermehrungserfolg waren für *H. bacteriophora* typisch, unabhängig von der Zahl der applizierten Nematoden.

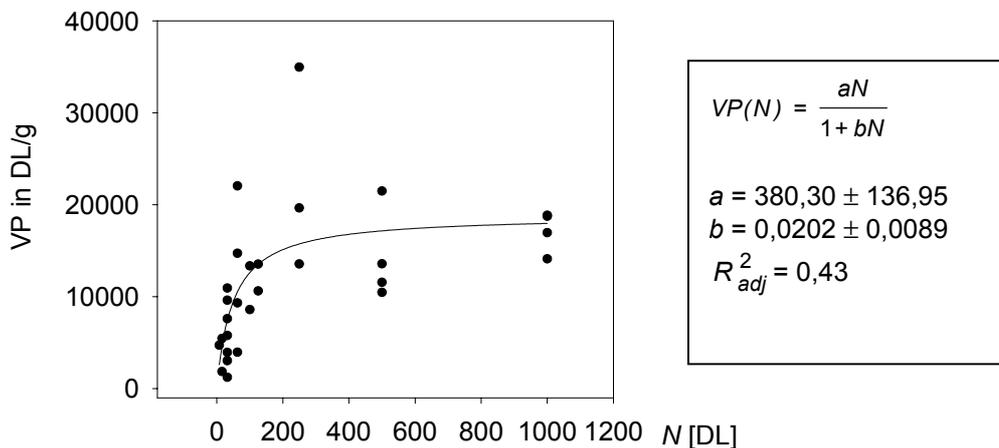


Abb. 3.48. Vermehrungspotential (VP) von *S. glaseri* in *M. melolontha*-Larven (L3) in Abhängigkeit von der Anzahl applizierter Nematoden (*N*). Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert einer Nematoden-Charge dar. Die Angleichung der Kurve erfolgte mit der in Begon *et al.* (1991) angegebenen Formel für ein durch intraspezifische Konkurrenz begrenztes Populationswachstum. DL = Dauerlarven.

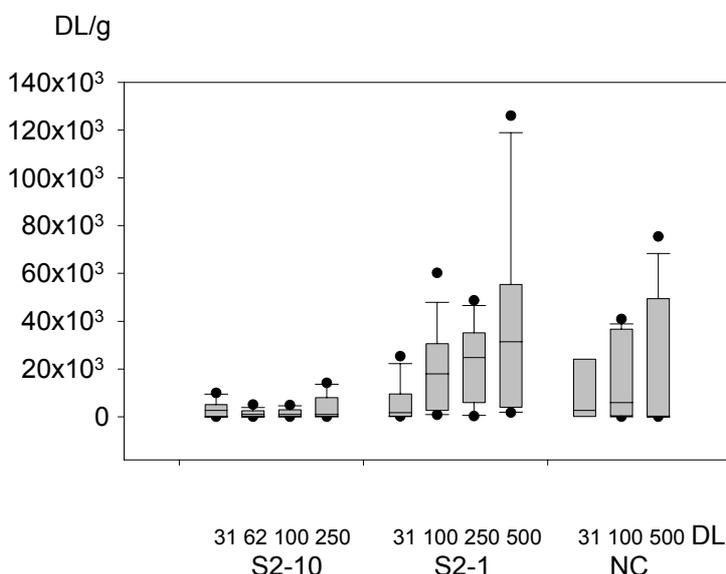


Abb. 3.49. Vermehrungspotential der Selektionslinien S2-10 und S2-1 sowie des Ausgangsstamms von *S. glaseri* (NC) bei verschiedenen Dosierungen der Nematoden. Die Werte unterscheiden sich aufgrund der großen Schwankungen nicht signifikant voneinander (Kruskal-Wallis-Test, Methode nach Dunn, $\alpha < 0,05$). DL = Dauerlarven. Die Boxen kennzeichnen das 50% Konfidenzintervall (von Interquartil 25 bis 75%) und die *Whiskers* das 80% Konfidenzintervall (von 10 bis 90%). Der Querstrich entspricht dem Median-Wert, die Punkte repräsentieren „Ausreißer“.

3.6 Vergleichende Untersuchungen an Inzuchtlinien

Mit den zur Verfügung stehenden 20 Inzuchtlinien von *H. bacteriophora* (Tab. 2.4) wurden Biotests an Larven des Mehlkäfers (*T. molitor*) durchgeführt. Dabei wurden die Parameter „Infektiosität“, „Penetrationsrate“ und „Vermehrungspotential“ bestimmt.

Für jeden dieser Parameter (Merkmale) wurde die Heritabilität ermittelt. Außerdem wurde die umweltbedingte Korrelation zwischen den Merkmalen bestimmt. Außer den genannten Merkmalen wurden für die 20 Inzuchtlinien noch Daten zur „recovery in Flüssigkultur“ (vgl. Abschnitt 1.2.1) und dem „Vermehrungspotential in Flüssigkultur“ ausgewertet. Die Rohdaten zu diesen beiden Merkmalen wurden dankenswerter Weise von Dr. R.-U. Ehlers und Dr. Olaf Strauch (Phytopathologisches Institut der Universität Kiel) zur Verfügung gestellt.

Versuchsdurchführung

Die Versuche an *Tenebrio*-Larven wurden mit dem Testsystem II durchgeführt. Zur Ermittlung der Infektiosität jeder einzelnen Inzuchtlinie und des Ausgangsstammes wurden pro *Tenebrio*-Larve 20 Nematoden appliziert; nach sieben Tagen wurde die Mortalität der *Tenebrio*-Larven ermittelt. Für jede Linie wurden 3-8 Wiederholungen (n = 24) mit verschiedenen Nematoden-Chargen durchgeführt. Als Charge wurde die aus einer infizierten *Galleria*-Larve gewonnene Dauerlarvenpopulation definiert (Strauch, 2002; pers. Mitteilung). Zusätzlich wurden für jede Inzuchtlinie Nematoden-Chargen aus zeitlich versetzten Vermehrungs-Serien verwendet (für jede Linie mind. jeweils eine Charge aus mind. drei Vermehrungsserien). Zur Ermittlung der Penetrationsrate wurden für jede Charge (3-8 pro Linie) mind. fünf infizierte (tote) *Tenebrio*-Larven sieben Tage nach Applikation der Nematoden seziiert und die penetrierten Nematoden gezählt. Da das Auszählen sehr viel Zeit in Anspruch nahm, wurde ein Teil der infizierten Larven eingefroren (-20°C) und zu einem späteren Zeitpunkt ausgewertet. Das Vermehrungspotential wurde ermittelt, indem sieben *Tenebrio*-Larven einer Charge in eine White-Falle gelegt und die Zahl der nach 10 Tagen ausgewanderten Dauerlarven auf das Lebendgewicht einer *Tenebrio*-Larve bezogen wurde (vgl. Abschnitt 2.2.1). Für jede Linie wurden vier Chargen ausgewertet.

3.6.1 Heritabilität

Die Inzuchtlinien von *H. bacteriophora* (PS7) zeigten mit Ausnahme der Penetrationsaktivität eine große Umweltvarianz in den untersuchten Merkmalen, so dass die Abschätzung (erwartungsgemäß) jeweils nur mit einem Teil der Inzuchtlinien möglich war.

Beim Vermehrungspotential in *Tenebrio*-Larven war die Umweltvarianz in fast allen Linien größer als die phänotypische Varianz des Ausgangsstammes, so dass keine sinnvolle Berechnung möglich war (Tab. 3.14). Die große Umweltvarianz des Vermehrungspotentials im Insekt, also *in vivo*, stimmt mit den Ergebnissen aus den Selektionsversuchen überein (vgl. Abschnitt 3.5.1). Damit wird die Abhängigkeit des Vermehrungspotentials von äußeren Faktoren bestätigt.

Eine relativ kleine Umweltvarianz hatte die Penetrationsaktivität. Die berechnete Heritabilität beträgt 0,70 und ist damit relativ groß (Tab. 3.13). Der mit Abstand größte Mittelwert für die Penetrationsaktivität der Inzuchtlinie B4 fällt auf. Möglicherweise waren alle verwendeten Chargen dieser Linie (zufällig) besonders gut, während für andere Linien immer auch schlechte Chargen dabei waren.

Tab. 3.12. Ermittlung des Schätzwerts für die Heritabilität (h_w^2) der Infektiosität des Hybrid-Stammes PS7 von *H. bacteriophora* gegenüber *Tenebrio*-Larven. Die Schätzwerte für σ_i^2 sind die jeweiligen Standardabweichungen (s_i). Werte, die mit mindestens einem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Kruskal-Wallis-Test, Methode nach Dunn, $\alpha < 0,05$). σ_u = umweltbedingte Standardabweichung (innerhalb einer Inzuchtlinie); σ_g = genetisch bedingte Standardabweichung; Mort. = Mortalität der *Tenebrio*-Larven; InzL = Inzuchtlinie; s = Standardabweichung; 95% KI = 95%iges Konfidenzintervall. Werte, die mit mindestens einem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Tukey-Test, $\alpha < 0,05$).

Inzuchtlinie	$\bar{\varnothing}$ Mort. (%)	σ_u (InzL)	σ_g (PS7)	h_i^2 (PS7)	$\overline{h_i^2}$ (PS7) $\pm s$	$\overline{h_i^2}$ (PS7) 95%KI
A1	43,75ab	37,40	< 0	-	0,575 ± 0,231	0,076 – 1,074
A4	80,30bab	15,41	21,44	0,659		
B2	84,39b	37,71	25,58	0,938		
B3	33,68ab	6,57	11,22	0,180		
B4	73,60ab	23,91	18,10	0,470		
B7	70,84ab	19,23	19,98	0,573		
B10	27,59a	17,26	< 0	-		
C2	75,60b	16,81	19,12	0,524		
C4	35,42ab	18,22	< 0	-		
C5	23,60a	27,72	17,45	0,437		
C7	40,00ab	19,82	20,36	0,595		
D1	27,10a	16,65	20,50	0,602		
D4	54,79ab	35,89	< 0	-		
D7	21,76a	9,74	24,55	0,864		
D11	37,24ab	21,44	15,42	0,341		
E6	75,01b	11,35	23,84	0,815		
E7	34,38ab	23,65	11,75	0,198		
F3	40,11ab	29,30	< 0	-		
G5	49,48ab	26,95	< 0	-		
H6	54,98ab	9,94	24,47	0,858		
PS7	41,07ab	26,41	0,00	-		

Tab. 3.13. Ermittlung des Schätzwerts für die Heritabilität (h_w^2) der Penetrationsaktivität (= PA) des Hybrid-Stammes PS7 von *H. bacteriophora* gegenüber *Tenebrio*-Larven. Alle übrigen Angaben siehe Tab. 3.12.

Inzuchtlinie	$\bar{\varnothing}$ PA (DL)	σ_u (InzL)	σ_g (PS7)	h_i^2 (PS7)	$\overline{h_i^2}$ (PS7) $\pm s$	$\overline{h_i^2}$ (PS7) 95% KI
A1	1,94ab	1,3490	2,0715	0,7022	0,700 ± 0,263	0,147 – 1,253
A4	2,33ab	1,5060	1,9603	0,6288		
B2	1,33ab	0,6510	2,3847	0,9306		
B3	2,67ab	1,7320	1,7638	0,5091		
B4	7,67b	5,4650	< 0	-		
B7	2,30ab	1,6830	1,8106	0,5365		
B10	2,27ab	1,5550	1,9217	0,6043		
C2	2,29ab	2,3390	0,7999	0,1047		
C4	1,53ab	1,1720	2,1765	0,7752		
C5	1,08a	0,2770	2,4564	0,9874		
C7	2,50ab	1,2910	2,1081	0,7273		
D1	1,18ab	0,3930	2,4406	0,9747		
D4	3,27ab	2,3700	0,7028	0,0808		
D7	1,20ab	0,4140	2,4371	0,9720		
D11	1,38ab	0,9240	2,2928	0,8603		
E6	1,59ab	1,2790	2,1154	0,7323		
E7	1,29ab	0,6860	2,3749	0,9230		
F3	1,63ab	1,6210	1,8663	0,5700		
G5	1,42ab	1,0650	2,2308	0,8144		
H6	1,54ab	0,8770	2,3112	0,8741		
PS7	2,26ab	2,4720	0,0000	-		

Tab. 3.14. Ermittlung des Schätzwerts für die Heritabilität (h_w^2) des Vermehrungspotentials (= VP) des Hybrid-Stammes PS7 von *H. bacteriophora* in *Tenebrio*-Larven. Alle übrigen Angaben siehe Tab. 3.12. Die Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Kruskal-Wallis-Test, Methode nach Dunn, $\alpha < 0,05$).

Inzuchtlinie	$\bar{\varnothing}$ VP (DL/g)	σ_u (InzL)	σ_g (PS7)	h_i^2 (PS7)	$\overline{h_i^2}$ (PS7) $\pm s$	$\overline{h_i^2}$ (PS7) 95% KI
A1	4678,57	1956,59	<< 0	-	n.m. *	n.m. *
A4	5642,86	297,38	581,75	0,7928		
B2	18464,29	4308,47	<< 0	-		
B3	14428,57	16372,78	<< 0	-		
B4	18464,29	4308,47	<< 0	-		
B7	10321,43	10812,80	<< 0	-		
B10	6928,57	10000,34	<< 0	-		
C2	4214,29	2152,36	<< 0	-		
C4	6500,00	3161,20	<< 0	-		
C5	14107,14	16150,39	<< 0	-		
C7	1500,00	1635,08	<< 0	-		
D1	9785,71	4826,94	<< 0	-		
D4	321,43	179,76	628,14	0,9243		
D7	5214,29	5695,80	<< 0	-		
D11	17000,00	1250,85	<< 0	-		
E6	6464,29	2031,64	<< 0	-		
E7	4464,29	5044,53	<< 0	-		
F3	3904,75	4347,56	<< 0	-		
G5	19428,57	13887,30	<< 0	-		
H6	3214,29	2302,03	<< 0	-		
PS7	1464,29	653,35	0,00	-		

* Die Berechnung von h^2 macht aufgrund der Datenstruktur (hohe umweltbedingte Varianz) keinen Sinn (siehe Text)

Tab. 3.15. Ermittlung des Schätzwerts für die Heritabilität (h_w^2) des Vermehrungspotentials (= VP) des Hybrid-Stammes PS7 von *H. bacteriophora* in Flüssigkultur. Werte, die mit mindestens einem gleichen Buchstaben gekennzeichnet sind, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Tukey-Test, $\alpha < 0,05$). Alle übrigen Angaben siehe Tab. 3.12. Diese Rohdaten wurden von Dr. Olaf Strauch (AG Dr. Ralf-Udo Ehlers, Phytopath. Inst., Univ. Kiel) zur Verfügung gestellt.

Inzuchtlinie	$\bar{\varnothing}$ VP (DL/ml)	σ_u (InzL)	σ_g (PS7)	h_i^2 (PS7)	$\overline{h_i^2}$ (PS7) $\pm s$	$\overline{h_i^2}$ (PS7) 95% KI
A1	215625,00c	40885,51	< 0	-	0,301 ± 0,232	-0,248 – 0,850
A4	168687,50bc	33175,87	7655,04	0,0506		
B2	178937,50bc	26477,00	21405,77	0,3953		
B3	110375,00a	52440,95	< 0	-		
B4	179625,00bc	25265,38	22823,21	0,4493		
B7	187000,00bc	19574,04	27858,49	0,6695		
B10	175062,50bc	24698,81	23435,16	0,4738		
C2	138500,00ab	39892,71	< 0	-		
C4	141625,00ab	29650,04	16736,58	0,2416		
C5	170500,00bc	35940,43	< 0	-		
C7	150625,00bc	37082,68	< 0	-		
D1	150375,00bc	60332,27	< 0	-		
D4	183250,00bc	45562,36	< 0	-		
D7	131500,00ab	37082,68	< 0	-		
D11	147750,00ab	49821,83	< 0	-		
E6	123000,00ab	33058,39	8147,45	0,0573		
E7	131625,00ab	36605,77	< 0	-		
F3	144875,00ab	32839,16	8990,41	0,0697		
G5	136250,00ab	57574,18	< 0	-		
H6	164000,00bc	45390,37	< 0	-		
PS7	129285,71ab	34047,59	0,00	-		

Tab. 3.16. Ermittlung des Schätzwerts für die Heritabilität (h_w^2) der *recovery* (= *rec*) des Hybrid-Stammes PS7 von *H. bacteriophora* in Flüssigkultur. Die Mittelwerte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Kruskal-Wallis-Test, Methode nach Dunn, $\alpha < 0,05$). Alle übrigen Angaben siehe Tab. 3.12. Diese Rohdaten wurden von Dr. Olaf Strauch (AG Dr. Ralf-Udo Ehlers, Phytopath. Inst., Univ. Kiel) zur Verfügung gestellt.

Inzuchtlinie	$\bar{\varnothing}$ <i>rec</i> (%)	σ_u (InzL)	σ_g (PS7)	h_i^2 (PS7)	$\overline{h_i^2}$ (PS7) $\pm s$	$\overline{h_i^2}$ (PS7) 95% KI
A1	45,56	23,45	< 0	-	0,199 ± 0,189	-0,248 – 0,646
A4	41,44	23,65	< 0	-		
B2	41,20	20,74	< 0	-		
B3	52,39	23,02	< 0	-		
B4	37,20	23,56	< 0	-		
B7	54,61	23,22	< 0	-		
B10	38,41	20,74	< 0	-		
C2	45,21	23,46	< 0	-		
C4	38,10	28,69	< 0	-		
C5	44,71	22,08	< 0	-		
C7	39,33	23,46	< 0	-		
D1	51,09	25,75	< 0	-		
D4	55,35	20,29	3,05	0,0221		
D7	48,83	19,99	4,63	0,0509		
D11	58,94	16,95	11,57	0,3179		
E6	32,95	19,95	4,83	0,0553		
E7	40,40	20,38	2,42	0,0139		
F3	31,91	14,33	14,69	0,5126		
G5	38,00	17,66	10,46	0,2597		
H6	23,03	16,42	12,31	0,3597		
PS7	33,07	20,52	0,00	-		

Die berechnete Heritabilität der Infektiosität gegenüber *Tenebrio*-Larven ist mit 0,58 relativ groß (Tab. 3.12). Das Merkmal Infektiosität umfasst auch die Penetrationsaktivität, da die Penetration der Nematoden für eine Infektion Voraussetzung ist; eine ähnliche Größenordnung der h^2 -Werte ist also zu erwarten.

Die Abschätzung der Heritabilität für das *recovery* in Flüssigkultur ergab einen Wert von etwa 0,20. Das *recovery*-Verhalten in Flüssigkultur ist demzufolge in erster Linie bzw. in größerem Ausmaß von Umweltbedingungen bedingt (Tab. 3.16).

Der im Vergleich zum Vermehrungspotential *in vivo* relativ hohe Wert der Heritabilität des Vermehrungspotentials in Flüssigkultur (*in vitro*) von etwa 0,30 ist auffallend (Tab. 3.15). Demzufolge ist das Vermehrungspotential in Flüssigkultur in höherem Maß genetisch bedingt. Genotyp-Umwelt-Interaktionen dürften hier eine große Rolle spielen.

3.6.2 Umweltbedingte Korrelation von Merkmalen

Der umweltbedingte Korrelationskoeffizient der Merkmale „Infektiosität“ und „Penetrationsaktivität“ beträgt 0,19 (Abb. 3.50), d.h. eine höhere Infektiosität bringt auch eine höhere Penetrationsaktivität mit sich. Warum der Wert nicht größer ist, hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass bereits ein penetrierter Nematode mit hoher Wahrscheinlichkeit den Tod der Larve verursacht.

Auch die Infektiosität und das Vermehrungspotential *in vivo* und *in vitro* sind positiv korreliert ($r_u = 0,12$ bzw. $0,09$; Abb. 3.50). Die kleinsten Werte für r_u ergaben sich zwischen den Merkmalen „*recovery* in Flüssigkultur“ und „Infektiosität bei *Tenebrio*-Larven“ ($0,02$) bzw. „Vermehrungspotential in *Tenebrio*-Larven“ ($-0,004$; Abb. 3.50). Diese kleinen Werte von r_u zeigen, dass die jeweiligen Merkmalsausprägungen in verschiedenen Umwelten sich nicht bzw. nur gering beeinflussen.

Auffallend sind die negativen Werte für r_u zwischen den Merkmalen Penetrationsaktivität und Vermehrungspotential *in vivo* ($-0,15$) und *in vitro* ($-0,30$; Abb. 3.50). Die negative Korrelation deutet darauf hin, dass sich die Inzuchtlinien mit höherer Penetrationsaktivität in Flüssigkultur schlechter vermehren.

Die ebenfalls negative Korrelation des *recovery*-Verhaltens und des Vermehrungspotentials in Flüssigkultur ($r_u = -0,16$) überrascht, da der Prozentsatz der Dauerlarven, die sich weiter entwickeln, die erste Hermaphroditen-Generation darstellt und somit das Vermehrungspotential eher positiv beeinflussen sollte. Eine eingehende Besprechung folgt im Diskussionsteil.

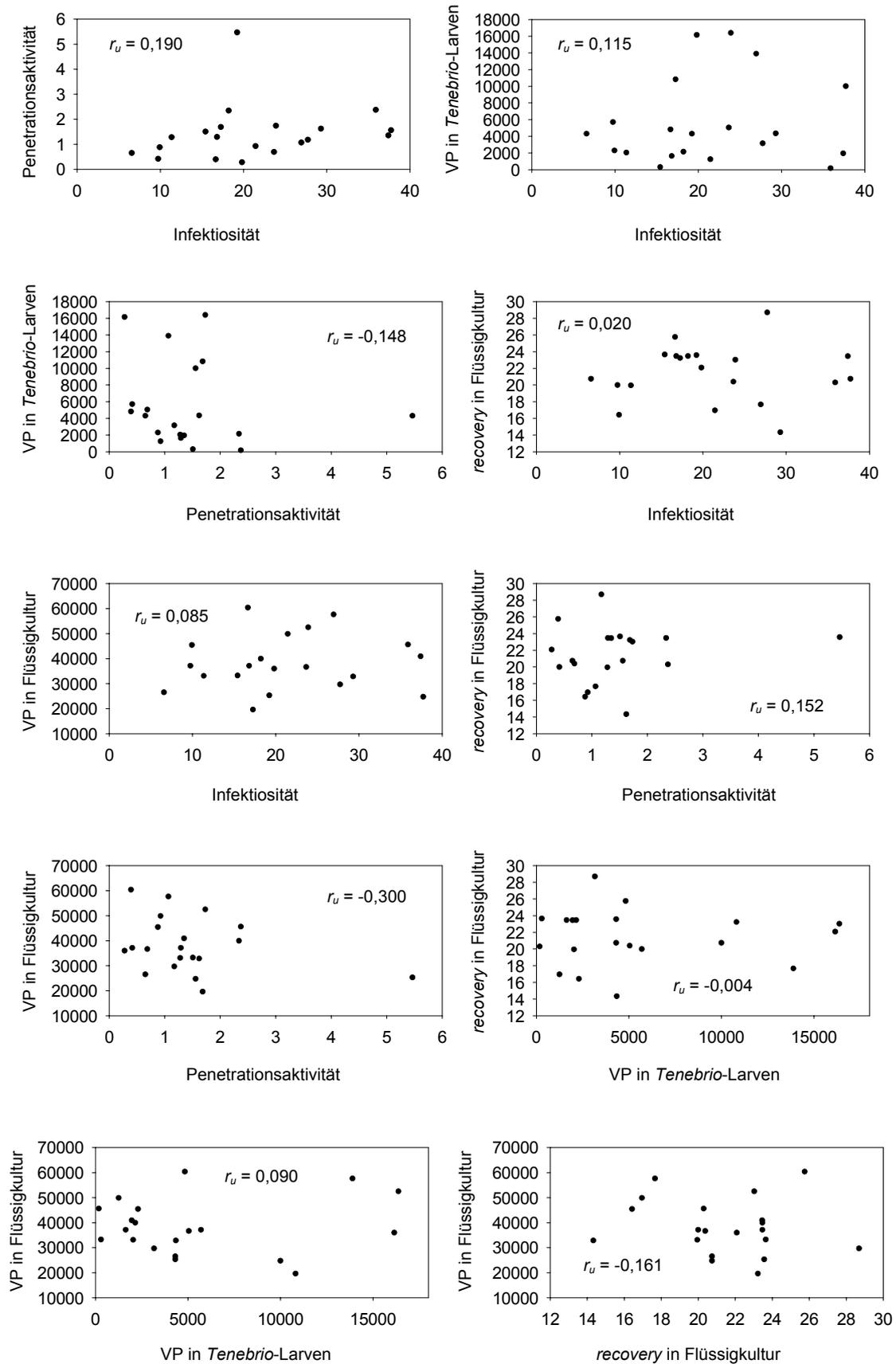


Abb. 3.50. Ermittlung des umweltbedingten Korrelationskoeffizienten r_u der 20 Inzuchtlinien von *H. bacteriophora* für die Merkmale „Infektiosität gegenüber *Tenebrio*-Larven“, „Penetrationsaktivität“, „Vermehrungspotential (VP) in *Tenebrio*-Larven“, „recovery in Flüssigkultur“ und „VP in Flüssigkultur“. Für jedes Merkmalspar sind die Standardabweichungen (s) als Schätzwert für den umweltbedingten Anteil (σ_u) des phänotypischen Korrelationskoeffizienten (r_p) jeder einzelnen Inzuchtlinie gegeneinander aufgetragen.

3.7 Molekularbiologische Untersuchungen

Die in der vorliegenden Arbeit angewandten DNA-*Fingerprinting*-Verfahren sollten helfen, die Verwandtschaftsverhältnisse unter den EPN aufzuklären. Dabei sollte geprüft werden, ob sich auch nahe verwandte Linien innerhalb eines Stammes (Inzucht- und Selektionslinien, Re-Isolate) unterscheiden lassen. Zum Einsatz kamen die Methoden der RAPD- und der ISSR-PCR, mit denen genetische Polymorphismen nachgewiesen werden können. Im Anhang sind für jeden Primer beider Methoden einige der angefertigten Gele dargestellt. Die berechneten Distanzmatrizen finden sich ebenfalls im Anhang. Die zur Veranschaulichung der Verwandtschaftsverhältnisse erstellten Dendrogramme sind in den Abschnitten 3.7.1 und 3.7.2 dargestellt. Im Abschnitt 3.7.3 folgt eine Gegenüberstellung der beiden Methoden. In Abschnitt 3.7.4 sind die Ergebnisse der Sequenzierung der DNA einzelner Banden der ISSR-PCR zu finden.

3.7.1 RAPD-PCR

Die Analyse der RAPD-PCR-Produkte erfolgte über eine Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromidfärbung (Abb. 8.1-8.11). In den Abbildungen sind die Ergebnisse der PCR für einige Stämme zweimal dargestellt (Wiederholungen). Dadurch wird ersichtlich, dass einzelne Banden bzw. Bandenmuster nicht reproduziert werden konnten. In solchen Fällen ergab eine dritte Wiederholung häufig Aufschluss. War die Existenz einer Bande, die bei anderen Stämmen reproduzierbar war, nach wie vor unsicher, wurde in der Matrix ein „?“ eingefügt. Analog wurde bei der ISSR-PCR vorgegangen.

In einigen Ansätzen waren keine PCR-Produkte nachweisbar. Der Primer S13 ergab für keinen Nematoden-Stamm PCR-Produkte.

Relativ gut reproduzierbare Bandenmuster ergaben die Primer A13 (Abb. 8.1), A18 (Abb. 8.2), C09 (Abb. 8.4), H04 (Abb. 8.7), H15 (Abb. 8.8), H18 (Abb. 8.9) und H19 (Abb. 8.10).

Für *C. elegans*, *H. marelatus*, *S. feltiae* und *S. sp. Devil* waren insgesamt (für alle Primer) relativ wenig PCR-Produkte nachweisbar. Die Einordnung dieser Arten war bei den nach dem Maximum-Parsimony und dem Neighbor-Joining-Verfahren erstellten Dendrogrammen unterschiedlich (vgl. Abb. 3.48 und 3.49). Nach dem UPGMA-Verfahren (keine Wurzelung durch die Definition von *C. elegans* als Außengruppe) wurde *C. elegans* in eine monophyletische Gruppe mit den *H. megidis*-Stämmen gestellt (Dendrogramm nicht dargestellt).

Die beiden Re-Isolate Re02 und Re08 von *H. bacteriophora* setzten sich am deutlichsten von den übrigen Linien der Hybrid-Gruppe (HYB, RW, H1-10, H1-14, PS7, PS7-A1, PS7-D7, PS7-H6) ab (Abb. 8.1-8.11).

Die amerikanischen Isolate von *H. bacteriophora* (NCI, UCD, W) wiesen deutliche Unterschiede zu den übrigen *H.b.*-Stämmen auf. Sie wurden in den Dendrogrammen daher an die Basis von *H. bacteriophora*, im Neighbor-Joining-Baum sogar an die Basis der Gattung *Heterorhabditis* gestellt (Abb. 3.48 und 3.49).

Auffällig sind die deutlichen und reproduzierbaren Unterschiede zwischen der „Wildform“ *S.* sp. Devil und dessen für einige Generationen in Flüssigkultur gezüchteten Linie Devil-FK (z.B. Abb. 8.2, 8.5, 8.8 und 8.10).

Die nach Nei & Li (1979) berechneten *p*-Distanzen für alle paarweisen Vergleiche sind in Tab. 8.6, die Distanzen zwischen den Arten in Tab. 3.17 dargestellt. Die Distanzwerte zwischen den Arten liegen im Bereich von 58-100%, der Mittelwert ist $76 \pm 2\%$.

Tab. 3.17. Durchschnittliche *p*-Distanzen (%) nach Nei & Li (1979) **zwischen** den Arten bei der RAPD-PCR-Analyse.

	1	2	3	4	5	6	7
1 <i>H.b.</i>	-						
2 <i>H.m.</i>	69	-					
3 <i>H.mar.</i>	62	76	-				
4 <i>S.g.</i>	74	77	68	-			
5 <i>S.a.</i>	66	80	66	58	-		
6 <i>S.f.</i>	88	89	62	77	63	-	
7 <i>C.e.</i>	88	78	82	80	89	100	-

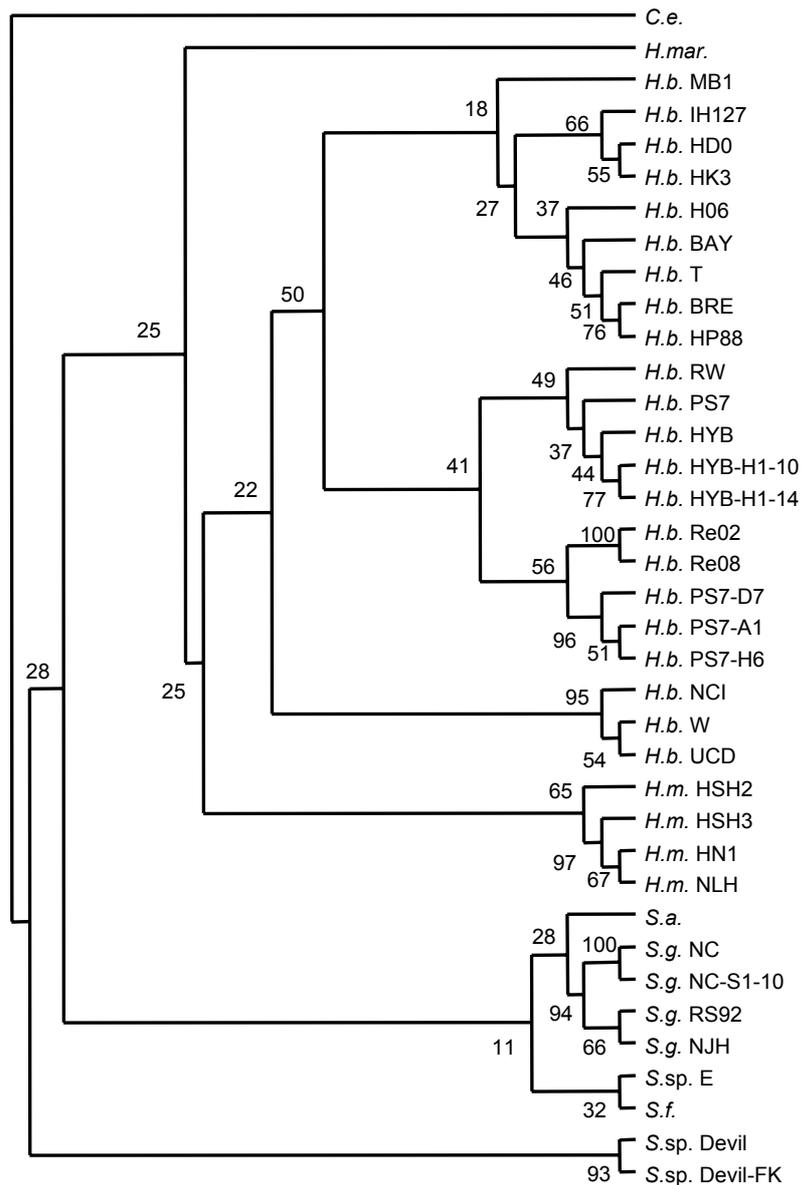


Abb. 3.51. Maximum-Parsimony Baum, erstellt anhand der RAPD-PCR-Analyse. Dargestellt ist der 50% *majority-rule consensus* Baum; die Astlängen haben keine Bedeutung. Der Bootstrap-Test wurde mit 1000 Replikaten durchgeführt; die Werte an den Astgabeln repräsentieren die Wiederfindungswahrscheinlichkeiten in Prozent (Werte < 10% sind nicht aufgeführt). Alle Berechnungen erfolgten mit dem Programm PAUP*4.0b4a (Swofford, 1998).

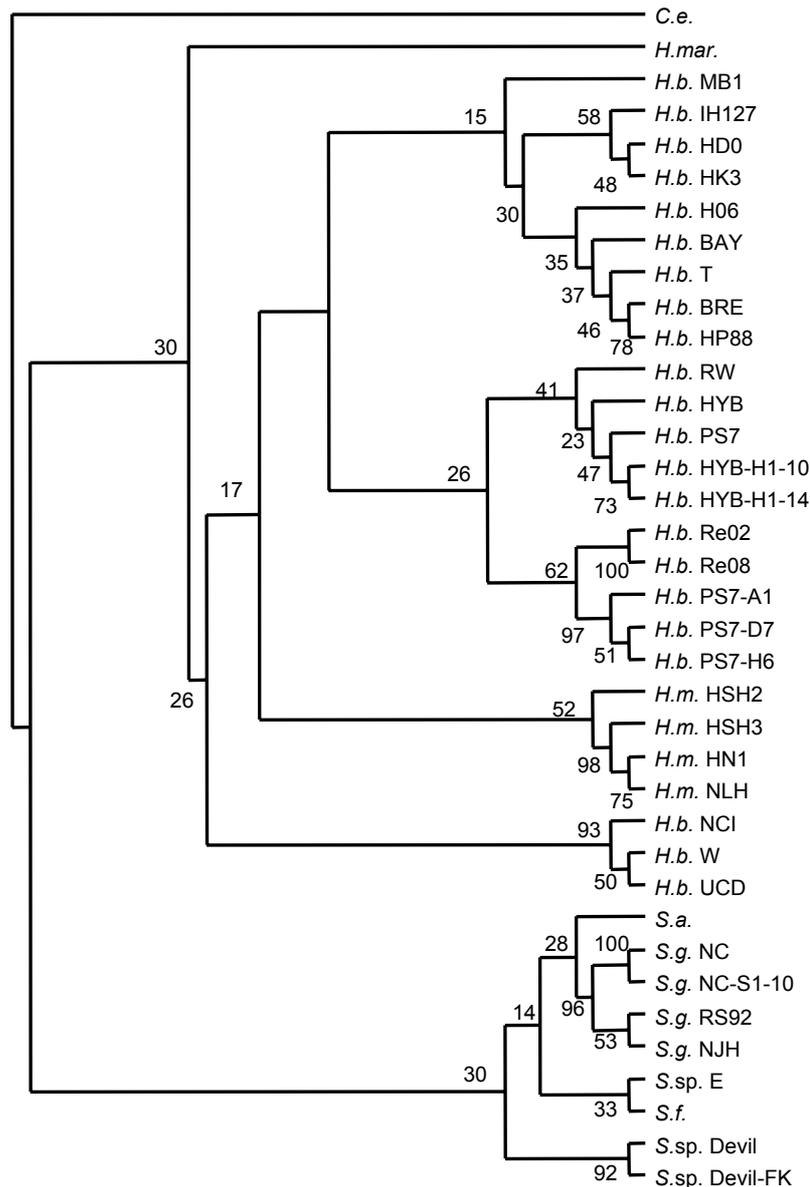


Abb. 3.52. Neighbor-Joining Baum ohne korrigierende Modellannahmen, erstellt anhand der RAPD-PCR-Analyse. Dargestellt ist der 50% *majority-rule consensus* Baum; die Astlängen haben keine Bedeutung. Der Bootstrap-Test wurde mit 1000 Replikaten durchgeführt; die Werte an den Astgabeln repräsentieren die Wiederfindungswahrscheinlichkeiten in Prozent (Werte < 10% sind nicht aufgeführt). Alle Berechnungen erfolgten mit dem Programm PAUP*4.0b4a (Swofford, 1998).

3.7.2 ISSR-PCR

Die Analyse der ISSR-PCR-Produkte erfolgte über eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung (Abb. 8.12-8.18). In den Abbildungen im Anhang sind die Gele aus Gründen der Platzersparnis um den Faktor 4-5 verkleinert. Die Linien der Hybrid-Gruppe von *H. bacteriophora* wurden auf den Gelen für die Inzuchtlinien mit aufgetragen (Abb. 8.19-8.26).

Im Gegensatz zur RAPD-PCR konnte bei der ISSR-PCR für alle Nematoden-Stämme bzw. – Linien ein etwa gleich großes Bandenmuster erzeugt werden. Die Reproduzierbarkeit einzelner Banden war im Vergleich zur RAPD-PCR deutlich besser. Bei einigen Primern waren einzelne Banden (Abb. 8.13 A) bzw. Bereiche des Bandenmusters (Abb. 8.16 A) für alle Arten und Stämme gleich. Bei den in diesen Fällen amplifizierten PCR-Produkten könnte es sich um hochgradig konservierte Genloci handeln bzw. die Genloci könnten in konservierten Bereichen des Genoms liegen.

Ein besonders einheitliches Bandenmuster war bei den meisten Primern für die vier *H. megidis*-Stämme (HNI, HSH2, HSH3, NLH) zu erkennen (z.B. Abb. 8.12, 8.13, 8.17). Zwischen der „Wildform“ der neu isolierten Art *S. sp. Devil* und dessen in Flüssigkultur gezüchteten Linie Devil-FK waren, ähnlich wie bei der RAPD-PCR, deutliche Unterschiede im Bandenmuster erkennbar (z.B. Abb. 8.12, 8.14, 8.17).

Zwischen den Selektionslinien und dem Ausgangsstamm von *S. glaseri* (NC, S1-10, S2-10) gab es ebenfalls deutliche Unterschiede (z.B. Abb. 8.12, 8.14). Gleiches gilt für die Selektionslinie H1-14 von *H. bacteriophora* HYB (z.B. Abb. 8.19 B, 8.21 A, 8.22 A). Die aus dem Freiland re-isolierten Linien des kommerziellen Hybrids (RW, Re02, Re08) waren alle vom Ausgangsstamm (HYB) unterscheidbar (z.B. Abb. 8.19 A, 8.20 B, 8.22 A, 8.23 A). Wie bei der RAPD-PCR setzten sich die beiden Linien Re02 und Re08 am deutlichsten ab.

Die nach Nei & Li (1979) berechneten *p*-Distanzen für alle paarweisen Vergleiche bei der ISSR-PCR-Analyse sind in Tab. 8.7, die Distanzen zwischen den Arten in Tab. 3.18 dargestellt. Die Distanzwerte zwischen den Arten liegen im Bereich von 59-89%, der Mittelwert ist $80 \pm 2\%$.

Zwischen den 5' und 3'-verankerten Primern war im Hinblick auf die Anzahl der Banden, den Anteil polymorpher Banden und in der „Schärfe“ der Banden kein wesentlicher Unterschied zu erkennen (vgl. z.B. Abb. 8.12 A mit 8.17 A sowie 8.18 A mit B). Bei den Primern (GACA)₄KT bzw. TK(GACA)₄ lieferte der 5'-verankerte Primer (Abb. 8.16 B) deutlich mehr Banden (Gele des 3'-verankerten Primers nicht dargestellt).

Die Art *C. elegans* wurde bei dem UPGMA-Baum an die Basis der Gattung *Heterorhabditis* gestellt (Abb. 3.55). Die Art *H. marelatus* wurde an der Basis von *H. bacteriophora* eingeordnet (Abb. 3.55). Im Gegensatz hierzu wurde *H. marelatus* im Parsimony- und im Neighbor-Joining-Baum an die Basis von *H. megidis* gestellt (vgl. Abb. 3.53 und 3.54).

Tab. 3.18. Durchschnittliche p -Distanzen (%) nach Nei & Li (1979) **zwischen** den Arten bei der ISSR-PCR-Analyse.

	1	2	3	4	5	6	7
1 <i>H.b.</i>	-						
2 <i>H.m.</i>	75	-					
3 <i>H.mar.</i>	73	66	-				
4 <i>S.g.</i>	86	89	86	-			
5 <i>S.a.</i>	84	83	84	70	-		
6 <i>S.f.</i>	84	86	85	75	59	-	
7 <i>C.e.</i>	81	85	83	85	86	83	-

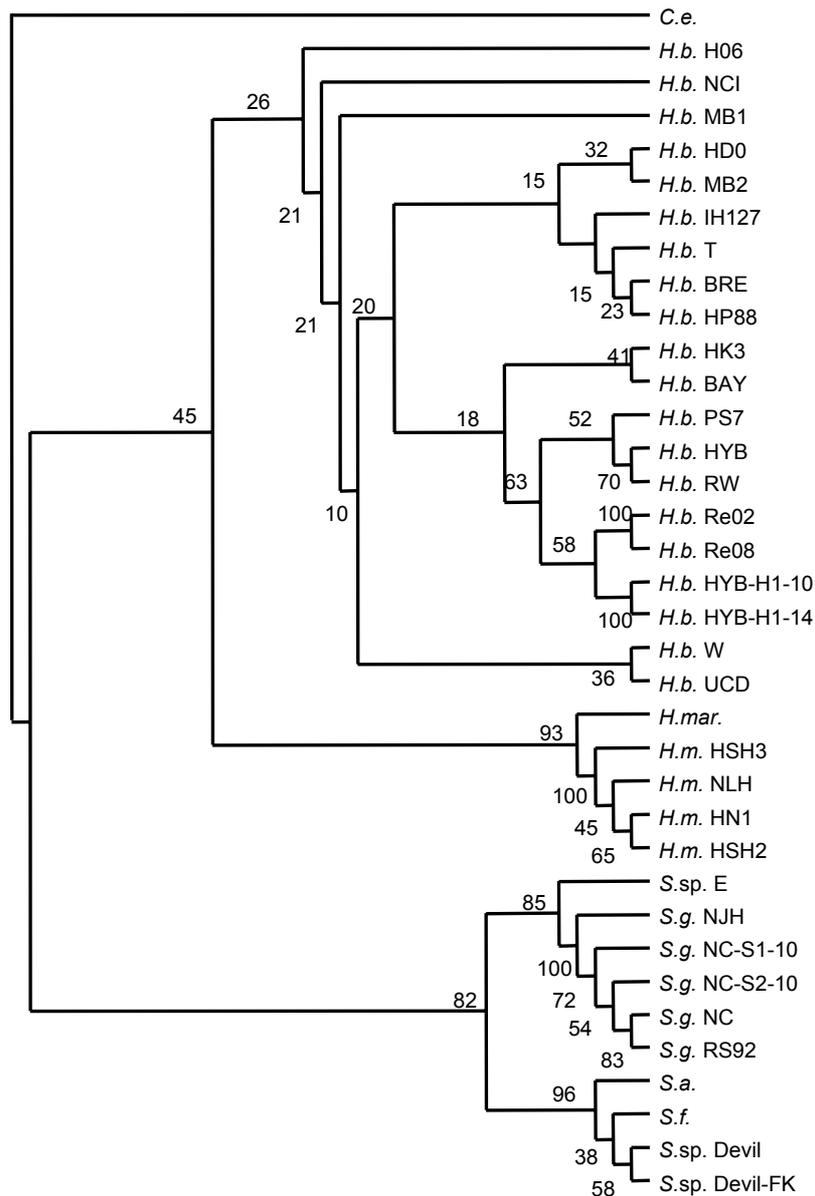


Abb. 3.53. Maximum-Parsimony Baum, erstellt anhand der ISSR-PCR-Analyse. Dargestellt ist der 50% *majority-rule consensus* Baum; die Astlängen haben keine Bedeutung. Der Bootstrap-Test wurde mit 1000 Replikaten durchgeführt; die Werte an den Astgabeln repräsentieren die Wiederfindungswahrscheinlichkeiten in Prozent (Werte < 10% sind nicht aufgeführt). Alle Berechnungen erfolgten mit dem Programm PAUP*4.0b4a (Swofford, 1998).

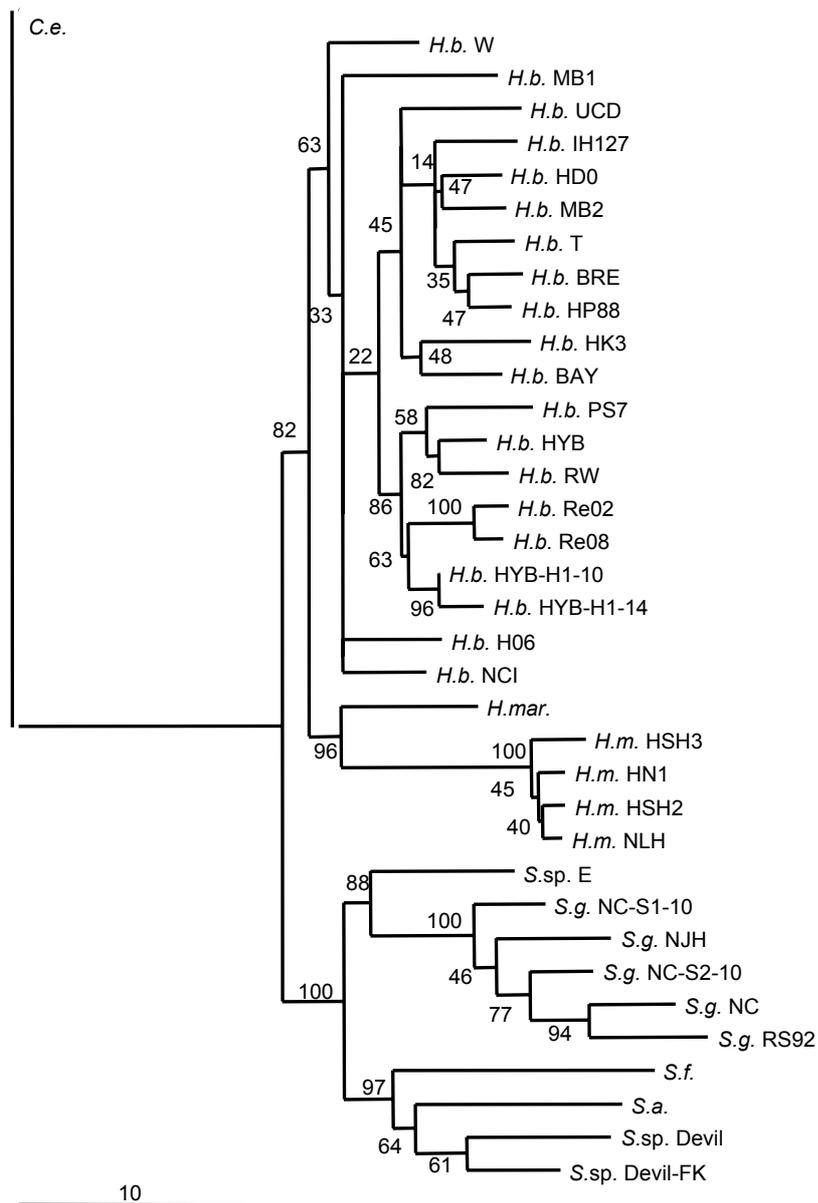


Abb. 3.54. Neighbor-Joining Baum ohne korrigierende Modellannahmen, erstellt anhand der ISSR-PCR-Analyse. Der Bootstrap-Test wurde mit 1000 Replikaten durchgeführt; die Werte an den Astgabeln repräsentieren die Wiederfindungswahrscheinlichkeiten in Prozent (Werte < 10% sind nicht aufgeführt). Skalierungsbalken: 10% Distanz. Alle Berechnungen erfolgten mit dem Programm PAUP*4.0b4a (Swofford, 1998).

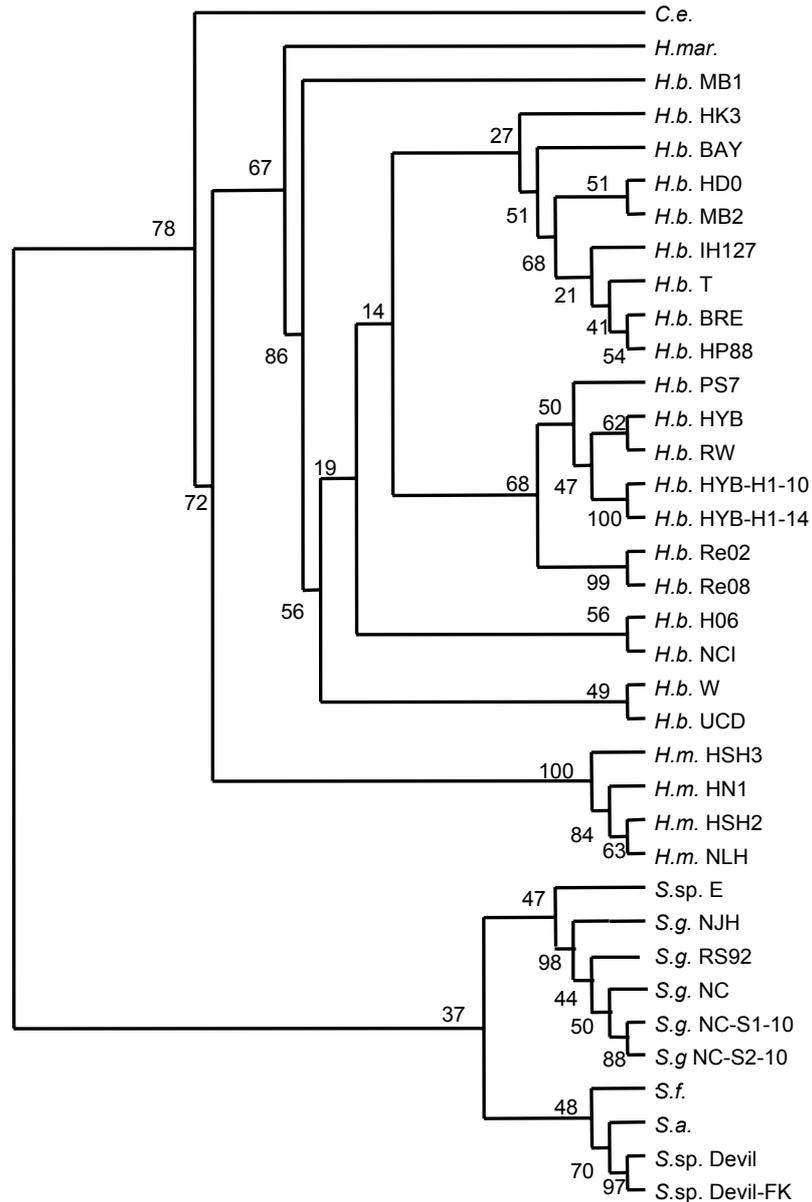


Abb. 3.55. UPGMA Baum, erstellt anhand der ISSR-PCR-Analyse. Der Bootstrap-Test wurde mit 1000 Replikaten durchgeführt; die Werte an den Astgabeln repräsentieren die Wiederfindungswahrscheinlichkeiten in Prozent (Werte < 10% sind nicht aufgeführt). Alle Berechnungen erfolgten mit dem Programm PAUP*4.0b4a (Swofford, 1998).

ISSR-PCR-Analyse bei den Inzuchtlinien

In den Abb. 8.19 bis 8.25 sind einige der ISSR-PCR-Profilen, die von den 20 Inzuchtlinien des *H. bacteriophora* PS7-Hybrids angefertigt wurden, dargestellt. Bei diesen Gelen wurde zusätzlich die *H.b.*-Hybrid-Gruppe (kommerzieller Hybrid, Re-Isolate und Selektionslinie) aufgetragen. In Abb. 8.25 B sind ISSR-PCR-Profile, die mit DNA aus Einzelnematoden erstellt wurden und in Abb. 8.26 ISSR-PCR-Profile, bei denen zwei ISSR-Primer kombiniert wurden, dargestellt. Das Dendrogramm für die Inzuchtlinien wurde mit dem UPGMA-

Verfahren berechnet (Abb. 3.56). Im UPGMA-Baum wurde der Ausgangsstamm (= PS7) an der Basis aller Inzuchtlinien eingeordnet.

Die Distanzwerte zwischen den Inzuchtlinien liegen im Bereich von 7-40%; der Mittelwert liegt bei $19 \pm 1\%$ (vgl. Tab. 8.8). Der in Tab. 3.19 angegebene Mittelwert ist im Vergleich hierzu höher (29%), da er als Mittelwert der Distanzwerte für jeden einzelnen Primer und nicht von der Gesamtmatrix berechnet wurde. Die Gewichtung der Einzelwerte ist in der Gesamtmatrix geringer.

Tab. 3.19. Zusammenfassende Darstellung der ausgewerteten Banden der ISSR-PCR bei dem Ausgangsstamm *H. bacteriophora* PS7 und den 20 davon abgeleiteten Inzuchtlinien. Neben der Bandenzahl ist die für jeden Primer berechnete durchschnittliche *p*-Distanz nach Nei & Li (1979) angegeben.

Primer	Bandenzahl (von bis)	<i>p</i> -Distanz (%)
(GA) ₈ YG	11 (10-11)	2
(GA) ₈ RC	6 (1-6)	35
(GA) ₈ YC	6 (3-6)	17
(ACTG) ₄ YG	8 (0-8)	48
(ACGA) ₄ YC	3 (0-3)	46
(GACAC) ₃ YG	3 (0-3)	35
(GACA) ₄ YC	7 (1-7)	29
(GACA) ₄ KT	3 (0-3)	48
CY (GACA) ₄	2 (0-2)	48
(CAG) ₅ YT	3 (3)	0
TK (GACA) ₄	5 (1-5)	26
GY (GA) ₈	3 (2-3)	4
CY (GA) ₈	6 (0-6)	10
ACTGY (GA) ₈	2 (0-2)	38
(GA) ₈ YGTCA	3 (0-3)	44
Σ	71 (21-71)	
∅ pro Primer	4,7 ± 0,7	29 ± 5

Beim Vergleich der ISSR-PCR-Profile für die verschiedenen Primer wird deutlich, dass der Anteil polymorpher Banden sehr unterschiedlich ist. Dies ist besonders gut bei den Inzuchtlinien erkennbar. Bei den Primern (GA)₈YG (Abb. 8.19 A), (GA)₈YC (Abb. 8.20 A), CY(GACA)₄ (Abb. 8.22 B), GY(GA)₈ (Abb. 8.23 B) und ACTGY(GA)₈ (Abb. 8.24 B) sind keine bzw. wenig polymorphe Banden auf dem Gel erkennbar. Wesentlich mehr polymorphe Banden lieferten z.B. die Primer (GA)₈RC (Abb. 8.19 B), (ACTG)₄YG (Abb. 8.20 B), (GACAC)₃YC (Abb. 8.21 B) und (GACA)₄YC (Abb. 8.22 A).

Das von der DNA aus zahlreichen Nematoden (= „Nematoden-Pool“) angefertigte ISSR-PCR-Profil stimmte sehr gut mit dem von der DNA aus einzelnen Nematoden überein (Abb. 8.25 B). Einzelne Banden waren im Bandenmuster einiger Einzelnematoden nicht vorhanden, wohl aber im Bandenmuster des Nematoden-Pools (vgl. Abb. 8.19 B und 8.25 B).

Zwischen den genetischen Distanzen und den phänotypischen Distanzen (siehe Abschnitt 3.6.1) der Inzuchtlinien bestanden keine signifikanten Korrelationen (Daten nicht dargestellt).

Die Werte für r lagen zwischen -0,15 und 0,05, d.h. die ISSR-PCR-Profile lassen keine Rückschlüsse auf Merkmalsausprägungen der Nematoden zu. Die phänotypischen Distanzen zwischen zwei Inzuchtlinien wurden mit dem F-Wert aus der ANOVA abgeschätzt (vgl. Gopal, 1999).

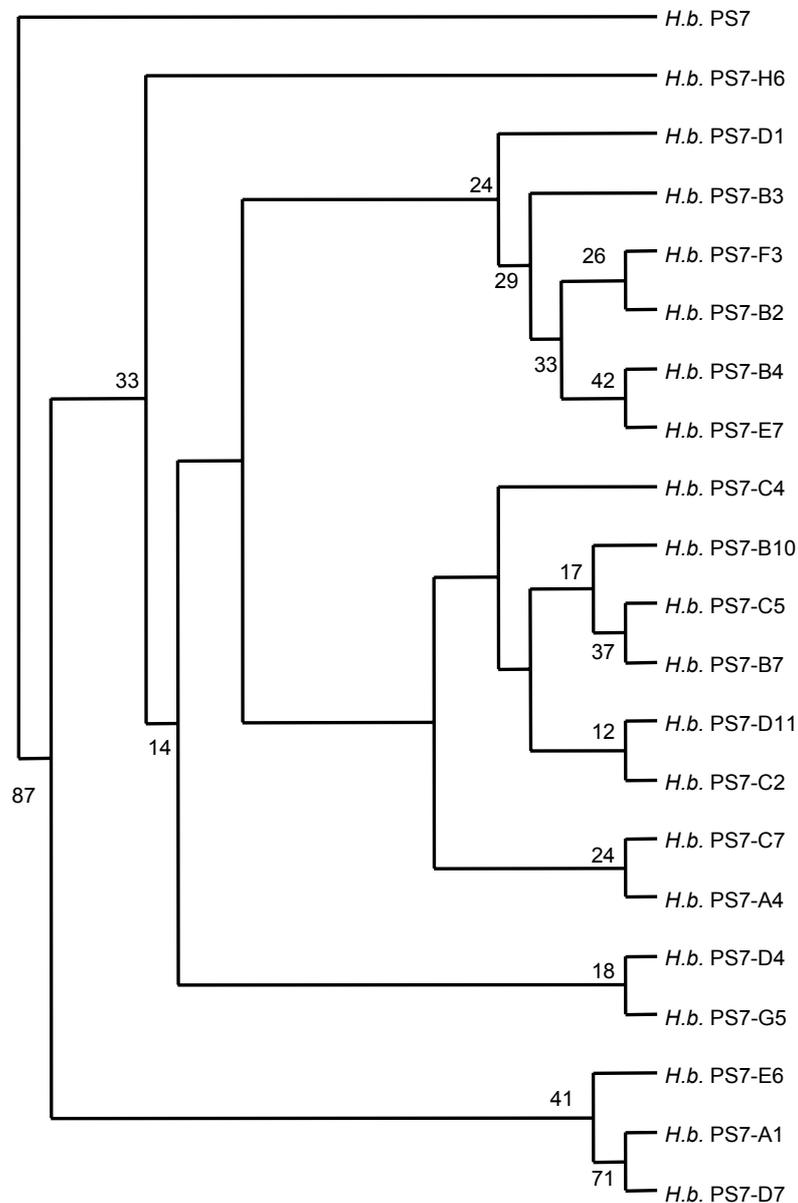


Abb. 3.56. UPGMA-Baum für die Inzuchtlinien des Ausgangsstammes *H. bacteriophora* PS7, erstellt anhand der ISSR-PCR-Analyse. Dargestellt ist der 50% majority-rule consensus Baum; die Astlängen haben keine Bedeutung. Der Bootstrap-Test wurde mit 1000 Replikaten durchgeführt; die Werte an den Astgabeln repräsentieren die Wiederfindungswahrscheinlichkeiten in Prozent (Werte < 10% sind nicht aufgeführt). Alle Berechnungen erfolgten mit dem Programm PAUP*4.0b4a (Swofford, 1998).

3.7.3 Gegenüberstellung der RAPD- und ISSR-PCR-Analysen

Die RAPD- und ISSR-PCR-Analysen lieferten bezüglich der ermittelten genetischen Distanzen ähnliche Ergebnisse (vgl. Tab. 3.17 und 3.18). Die Zahl der pro Primer und der

insgesamt auswertbaren Banden ist bei der ISSR-PCR jedoch deutlich höher (Tab. 3.20). Dies dürfte unter anderem auf der empfindlicheren Nachweismethode für die DNA-Fragmente bei der ISSR-PCR-Analyse beruhen. Die in Tab. 3.20 angegebene Summe der Bandenzahl entspricht der Gesamtzahl berücksichtigter Merkmale in der 1/0-Matrix.

Einige Gruppierungen wurden mit beiden Methoden übereinstimmend ermittelt, z.B. die *H. bacteriophora*-Hybrid-Gruppe, die *H. megidis*-Gruppe und die *S. glaseri*-Gruppe (vgl. Abb. 3.51, 3.52 und 3.53-3.55). Die Art *H. marelatus* wurde bei der RAPD-PCR-Analyse an die Basis der Gattung *Heterorhabditis*, bei der ISSR-PCR-Analyse dagegen in eine monophyletische Gruppe mit *H. megidis* gestellt (mit Ausnahme des UPGMA-Baumes; vgl. Abb. 3.51, 3.52 und 3.53-3.55).

Einzelne Stämme bzw. Gruppierungen wurden in den Parsimony-, Neighbor-Joining- und UPGMA-Bäumen unterschiedlich eingeordnet. Bei der RAPD-PCR-Analyse wurden z.B. die Stämme *H.b.* NCI, W, UCD und die noch unbeschriebene Art *S. sp.* Devil verschieden eingeordnet (vgl. Abschnitt 3.7.2; Abb. 3.51 und 3.52). Bei der ISSR-PCR-Analyse wurden die Stämme *H.b.* NCI, W, UCD, H06 und MB1 etwas unterschiedlich, aber alle im Basisbereich von *Heterorhabditis* bzw. *H. bacteriophora* angeordnet (Abb. 3.53-3.55).

Die Einordnung der *Steinernema*-Stämme ist bei der RAPD-PCR-Analyse etwas anders als bei der ISSR-PCR-Analyse. Die Art *S. arenaria* wurde bei der RAPD-PCR in eine monophyletische Gruppe mit *S. glaseri* gestellt, während sie bei der ISSR-PCR zusammen mit den Arten *S. feltiae* und *S. sp.* Devil einem extra Ast zugeordnet wurde (vgl. Abb. 3.51, 3.52 und 3.53-3.55). Bei der ISSR-PCR-Analyse wiesen dagegen alle drei Bäume die gleiche Anordnung der *Steinernema*-Arten auf (Abb. 3.53-3.55).

Tab. 3.20. Zusammenfassende Darstellung der ausgewerteten Banden bei den RAPD- und ISSR-PCR-Analysen.

RAPD		ISSR	
Primer	Bandenzahl	Primer	Bandenzahl
A13	19	(GA) ₈ YG	40
A18	13	(GA) ₈ RC	21
C06	11	(GA) ₈ YC	41
C09	17	(ACTG) ₄ YG	19
C11	18	(ACGA) ₄ YC	33
C12	12	(GACAC) ₃ YG	32
H04	14	(GACA) ₄ YC	32
H15	10	(GACA) ₄ KT	12
H18	13	CY(GACA) ₄	27
H19	11	(CAG) ₅ YT	3
S16	9	TK(GACA) ₄	33
S13	-	GY(GA) ₈	29
		CY(GA) ₈	28
		ACTGY(GA) ₈	26
		(GA) ₈ YGTCA	40
Σ	147	Σ	416
∅ pro Primer	13 ± 1	∅ pro Primer	28 ± 3

Die größte durchschnittliche Distanz zwischen den geografischen Stämmen wurde mit beiden Methoden innerhalb der Art *H. bacteriophora* (47-48%) und die kleinste innerhalb der Art *H. megidis* (11-36%) ermittelt (Tab. 3.21).

Bei der RAPD-PCR gab es im Vergleich zur ISSR-PCR keine Gele, in denen Banden oder sogar Bandenmuster bei allen untersuchten Nematodenarten und –stämmen identisch waren (Abschnitt 3.7.2; z.B. Abb. 8.16 A).

Tab. 3.21.

Durchschnittliche *p*-Distanzen (%) nach Nei & Li (1979) **innerhalb** der Arten (= zwischen den Isolaten) sowie **innerhalb** eines Isolates (Re-Isolate, Inzuchtlinien, Selektionslinien, Flüssigkulturlinie).

Gruppe	<i>p</i> -Distanz (Zahl der verglichenen Isolate)	
	RAPD	ISSR
<i>Heterorhabditis</i> (ohne Re-Isolate und Selektionslinien)	56 (19)	57 (20)
<i>H. bacteriophora</i> (geografische Stämme)	48 (12)	47 (13)
<i>H. bacteriophora</i> -Hybride (kommerz. Hybrid und Re-Isolate ohne PS7)	37 (4)	35 (4)
<i>H. bacteriophora</i> PS7 und Inzuchtlinien	16 (4)	19 (21)
<i>H. bacteriophora</i> HYB und Selektionslinie (<i>H.b.</i> HYB versus HYB H1-10/14)	15 (3)	23 (3)
<i>H. megidis</i> (geografische Stämme)	36 (4)	11 (4)
<i>Steinernema</i> (ohne Selektionslinien)	65 (7)	60 (7)
<i>S. glaseri</i> (geografische Stämme)	36 (3)	31 (3)
<i>S. glaseri</i> NC-Selektionslinien (<i>S.g.</i> NC versus NC S1-10/S2-10)	7 (2)	26 (3)
<i>S. sp.</i> Devil „Wildtyp“ versus Flüssigkultur-Linie (= FK)	23 (2)	44 (2)

3.7.4 Sequenzierung der DNA einzelner Banden aus der ISSR-PCR-Analyse

Die Sequenzierung der DNA einiger polymorpher Banden hatte das primäre Ziel, spezifischere Primer für Gruppen von Inzuchtlinien bzw. für einzelne Inzuchtlinien ableiten zu können. Darüber hinaus wurden die erhaltenen Sequenzen mit Sequenzen aus Datenbanken verglichen. Die Banden, deren DNA sequenziert wurde, sind auf den Abbildungen der entsprechenden Gele gekennzeichnet (siehe Anhang).

Die höchste Übereinstimmung mit einer Sequenz aus der BLAST-Datenbank bestand bei der Bande „B1“ des Primers (GA)₈RC mit der Phosphorribosyl-Transferase „PA0489“ von *Pseudomonas aeruginosa*. Die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Übereinstimmung war mit $p = 0,0042$ jedoch zu groß, als dass von einer Homologie auszugehen wäre. Bei allen anderen Sequenzen konnten keine homologen Sequenzen gefunden werden bzw. die Wahrscheinlichkeiten einer zufälligen Übereinstimmung waren viel zu hoch.

Im Folgenden sind die ermittelten Sequenzen dargestellt. Unterstrichene Bereiche entsprechen den Primer-Sequenzen (N = Base konnte nicht bestimmt bzw. zugeordnet werden).

- (GACAC)₃YC x (ACTG)₄YG, Bande „K1“ (vgl. Abb. 8.26 C)

```

1   NNNAANNAAA AGGGGGNCCA ACNCAAGNNC CCCCCCCCCC TTTTCCGGTT TTAACAAAAG
61  GGCCCGGTNC CCCCAGGGGG GGTGGGGCCC GGGGGGCCTT TCCNNGGNTA AAATNTTCCG
121 GGGGTGGGGT NCCCGGTNGG GTTNCCNGN TGGGGTNAAA AAA

```

- (GACAC)₃YC x (ACTG)₄YG, Bande „K6“ (vgl. Abb. 8.26 C)

```

1   CNNNNACNGA ATTATACTGC CTGCGTANGC AGNGTAGCTG CAACCTCTAT TAGCAGGCGG
61  AATAGTCAAA AATGATATAG TAGGAGTGAT ATTATAGGTA TTGGCGGNGT CGGTTCGTGG
121 TCAACAN

```

- (GA)₈RC, Bande „B1“ (vgl. Abb. 8.19 B)

```

1   GCCNGGATTA GAGAGAGAGA GAGACAAACC GGTGCAGCGA GGCATAGGGC GTGGCGAGCG
61  TATCAAGCAG GCAAAGAACG CGTTTACCTG TCAGGCTCAG CTCGATGGCA ATGGTGTTTA
121 TCTATTGATT GATGACGTAG TGACGACAGG CGCAACCGTA CGATATGGCG CAAAAGCATT
181 AAAAGCCGCA GGCGCTTGAA GATGTATGGG TGGCATCAAT TAGTCGTCAA CCTCTCGACT
241 GAATGCCTAT AATCTGATAC CATGGTTTTC GTACACTTGC ACATGGAGAG GTGCTGAGT
301 GGTGGAAGGG AACGGTCTTG AAGACCGTCG AGCCGGCACC GGTTCGGAGA GGTTCGGAGA
361 GTTCGAATCT CTCTCTCTCT CTAATCACTA GTGCGGCCG C TG CAGGTTCG

```

- (GA)₈RC, Bande „B2“ (vgl. Abb. 8.19 B)

```

1   TGGCCGCGGG ATTGAGAGAG AGAGAGAGAC TGAAGGATTA GAGAAATATT TGAAAAATAT
61  TGGCTTAAAA ATATGTTATA ACTATTTATT GTTAATGTCT ACCTTAGAAA ATAATGGACT
121 CTTTGGAGAA TTTTATTACT TATAAAGTAT AAGAAGTTCA ATTTACTTTT GCTTATTTCA
181 AGGACAAAGT GCGGTAGAAA AGATGGTGTG CCTCTCTTGA CGCCCTTCCG TACAGAATTC
241 GGGTCCTTTT GAAAAAGTAG TTGGGGGGGAC AGCAAGGTGG AAGGAAGAAG TCGGAATCCT
301 GTTCTTGAA ATACTAAATA CCTGCANAAG AATTGCCGAT TGGCTCTACA GGGANCCN CN
361 TNCTTTCCTG GCCATGGTTT AAACCGGAAA GCCCAAACCC CCCCCCCCCC CCCC AATCAC
421 CTAAGGGCGG CCGC

```

- (GA)₈RC, Bande „B3“ (vgl. Abb. 8.19 B)

```

1   GGGCCCGCGT CCTGCTCCCG GCCGCCTGGC CGCGGGATTG AGAGAGAGAG AGAGACTGAA
61  GGATTAGAGA AATATTTGAA AAATATTGGC TTAAAAATAT GTTATAACTA TTTATTTGTTA
121 ATGTCTACCT TAGAAAATAA TGA CTCTTTG GAGAAATTTT ATTACTTATG AAGTATAAGA
181 GTTCAATTTA CTTTGTCTTA TTTCAAGGAC AAAGTGCGGT AGAAAAGATG TGTGCCTCTC
241 TTGACGCCAT TCGTACAGAA TTCCGGGTCT TTGNANNAGC NCTNGCGGCN CCNCCNGGNN
301 NGNCGGAGCC CAANCCNNNN NCCTGCCNCC CTNNCCCCCC CGCCCCCAGN NCCCCCTGGC
361 CNCCNGNNC CCCCCTCTTC CCCGNGCCCN CNCCCCCNCC CCNCCCCCTNC TCCNCCNCC
421 CCCCCNCC NCG

```

- (GA)₈RC, Bande „B4“ (vgl. Abb. 8.19 B)

```

1   NNNCCCGNCG NCGCATGCTC CCGGCCGCTG GCCCGCGGGA TTGAGAGAGA GAGAGAGATT
61  TGGCTTACAG TTA AACATG AACAGTAAAG AAGAGGTACC TG TAGAGCAA TCGGCAATCT
121 GTTGACAGTTA TTAGTATTAC AAGAACAGAA TCGCACTCTT CCTTCACTTG GCTGTCCAC
181 AACTACTTTT CAAAGACCCG AATTCTGTAC GAATGGCGTC AAGGAGAGGC ACACATCTTT
241 TCTACCGCAC TTTGGNCCTT GGAAATAAGC AAAAGTAAAT TGGA ACTCTT ATACTTTTAT
301 AAGTAATAAA ATTCTTCCAA AGGAGGCATT ATTTTNTAN GGNGGACCTT ACCAATAAAT
361 NGNTNTAACA TATTTTTTAA GCCCATATTT TTCAAAAATT TCTCTAANCC T

```

4. Diskussion

4.1 *Screening* verschiedener Nematodenarten und -stämme

Gaugler *et al.* (1994) erreichten bei *S. carpocapsae* durch Selektion eine 72-fache Steigerung der Wirtsfindung (Larven des Japankäfers), konnten aber keine Steigerung der Infektiosität erreichen. Die Autoren führten dies auf mangelnde Fähigkeit (Anpassung) dieses Nematoden-Stammes, Scarabaeiden-Larven zu befallen, zurück und betonen, dass die wichtigste Voraussetzung zur Verbesserung eines Nematoden-Stammes die Vorauswahl geeigneter (angepasster) Stämme darstellt (Gaugler & Campbell, 1991; Gaugler *et al.*, 1989b).

Die hier berichteten Ergebnisse des *Screenings* von 26 Stämmen der Nematodenarten *H. bacteriophora*, *H. marelatus*, *H. megidis*, *S. arenaria*, *S. feltiae* und *S. glaseri* sowie zweier noch nicht spezifizierter Arten/Stämme der Gattung *Steinernema* heben *S. glaseri* hervor: Die höchste Wirksamkeit sowohl gegen Larven des Feld- und Waldmaikäfers als auch des Junikäfers besaß nach Applikation von 1000 Nematoden pro Larve *S. glaseri* mit 60-80% Mortalität (Tab. 3.1). Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen von Peters (2000a) und Sulistyanto (1997) überein. Die Art *S. glaseri* wurde ursprünglich aus Larven des Japankäfers (*Popilliae japonica*) isoliert (Glaser & Fox, 1930), der ebenfalls zu den Blatthornkäfern (Familie Scarabaeidae) gehört. Die bisher publizierten Vorkommen von *S. glaseri* in Insekten unter natürlichen Bedingungen erwähnen ausschließlich Isolationen aus Käferlarven der Familien Cerambycidae (ein Nachweis) und Scarabaeidae (drei Nachweise) (Peters, 1996); die Art ist demnach unter natürlichen Verhältnissen auf Larven von Scarabaeiden spezialisiert. *S. glaseri* wurde bereits 1935 von Glaser & Farrell in Freilandapplikationen zur Bekämpfung des Japankäfers eingesetzt (erstmaliger Einsatz eines EPN in der biologischen Schädlingsbekämpfung überhaupt). Weitere Freilandapplikationen gegen den Japankäfer erwähnen Wright *et al.* (1988) und Shetlar *et al.* (1988). Das Vorkommen von *S. glaseri* erstreckt sich von Nord- bis Südamerika. Eine mögliche Zulassung zur biologischen Maikäferbekämpfung in Europa stößt daher auf Schwierigkeiten. Die Art *S. glaseri* ist relativ wärmebedürftig; erste Versuche mit der Ausbringung von *S. glaseri* in Holland ergaben, dass die Nematoden offenbar den Winter nicht überstanden (Peters, 2000; pers. Mitteilung).

4.1.1 Verwandte des *S. glaseri* in Europa

Ein vielversprechender Ansatz, einen heimischen und daher klimatisch angepassten und vergleichbar gut wirkenden Nematoden zu finden, ist die gezielte Suche nach weiteren Arten

und Stämmen aus dieser Verwandtschaftsgruppe in Europa. Die Problematik der Isolierung und des Nachweises entomopathogener Nematoden aus dem Freiland wird im Abschnitt 4.1.6 diskutiert.

Ein naher Verwandter von *S. glaseri* ist die erstmals in Russland und ebenfalls aus einer Scarabaeiden-Larve (*Anomala dubia*) isolierte Art *S. anomali* (Kozodoi, 1984). Diese Art ist identisch mit der früher beschriebenen und aus Larven des Waldmaikäfers (*M. hippocastani*) isolierten Art *S. arenaria* (Artyukhovsky, 1967; Poinar, 1992); die Art wird heute daher als *S. arenaria* geführt (Hominick *et al.*, 1997). In den Biotests erzielte der verwendete Stamm von *S. arenaria* allerdings nur für Larven des Waldmaikäfers eine etwas höhere Wirksamkeit, während er in Larven des Feldmaikäfers kaum zur Vermehrung kam (Tab. 3.1). In jüngeren Arbeiten werden und wurden immer wieder *Steinernema*-Isolate aus Europa beschrieben, die der '*S. glaseri*-Gruppe' (engl. '*glaseri group*') zugeordnet werden, jüngst z.B. in Frankreich, Italien, Polen, der Schweiz, der Slowakei, Spanien, der Tschechischen Republik und Russland (Kramer *et al.*, 2000; Peters, 2002, pers. Mitteilung). Das herausragende Charakteristikum der Nematoden aus dieser Gruppe sind die besonders großen Dauerlarven (Poinar, 1990; vgl. Abb. 1.1).

Der erst kürzlich in Marokko aus Larven von *Rhizotrogus spec.* (Scarabaeidae) isolierte und in dieser Arbeit untersuchte *Steinernema*-Stamm 'Marokko Devil' scheint der '*S. glaseri*-Gruppe' nicht nahe zu stehen (Peters, 2002; pers. Mitteilung; vgl. Abschnitt 4.7.6), zeigte in den Biotests aber gleich gute Ergebnisse wie *S. glaseri*. Auffallend bei diesem Isolat war die besonders schnelle Wirkung und die nahezu vollständige Aufzehrung der befallenen Larven. Eine weitere Diskussion der Verwandtschaftsverhältnisse und Möglichkeiten einer molekularen Differenzierung folgt im Kapitel über die DNA-Fingerprinting-Analysen (4.7).

Vor kurzem wurde ein weiteres *Steinernema*-Isolat aus den USA beschrieben, das in hohem Maß infektiös für Scarabaeiden-Larven ist, dessen Dauerlarven aber vergleichsweise klein sind (Koppenhöfer, 2001; pers. Mitteilung). Als Name für dieses Isolat wurde *S. scarabaei* vorgeschlagen (Ehlers, 2002; pers. Mitteilung). Eine weitere auf Scarabaeiden-Larven spezialisierte Nematodenart ist der in Japan aus Larven von *Anomala cuprea* isolierte *S. kushidai* (Mamiya, 1988).

4.1.2 Generalisten und Spezialisten – Vergleich *S. feltiae* und *S. glaseri*

Im Gegensatz zu *S. arenaria* und *S. glaseri* konnte für die dritte untersuchte Art aus dieser Gattung, *S. feltiae*, keine Infektion einer Maikäfer- oder Junikäferlarve beobachtet werden (Tab. 3.1). Ein Vergleich der publizierten Freilandnachweise dieser Art zeigt, dass ein relativ

breites Spektrum an Insektenarten abgedeckt wird: 22 Insektenarten aus 9 Familien und 4 Ordnungen (Koppenhöfer, 2001; pers. Mitteilung). Das Spektrum reicht von einigen Käferarten (z.B. Elateridae, Pythidae und Curculionidae) einschließlich des Junikäfers (*A. solstitialis*) bis hin zu Dipteren-Larven (Bibionidae) und Lepidopteren-Larven (Noctuidae) (Peters, 1996). Im Gegensatz zu *S. glaseri* scheint diese Art in Bezug auf das Wirtsspektrum daher eher ein Generalist zu sein.

Unter Laborbedingungen stellte Peters (1994) eine hohe Wirksamkeit von *S. feltiae* gegen Schnakenlarven (*Tipula* spp.) fest (100 Nematoden pro Schnakenlarve bewirkten etwa 70-100% Mortalität), während *S. glaseri* kaum infektiös war (etwa 20% Mortalität). Diese Befunde untermauern die Spezifität der Nematoden selbst unter Laborbedingungen. Unter Freilandbedingungen ist eine weitaus höhere Spezifität anzunehmen (Gaugler *et al.*, 1997). Die Gründe für die Spezifität auf bestimmte Insektenarten werden im Kapitel über die Infektionsbiologie der Nematoden eingehend diskutiert (Kapitel 4.3 und 4.4).

4.1.3 *H. bacteriophora* als natürlicher Gegenspieler des Mai- und Junikäfers

Die untersuchten *H. bacteriophora*-Stämme hatten gegen Larven des Feldmaikäfers eine relativ geringe Wirkung von etwa 5-30% bei Applikation von 1000 Nematoden pro Larve. Das beste Ergebnis wurde durch den Stamm HK3 erzielt. Dieser Stamm wurde, wie auch der Stamm HD01, aus Larven des Junikäfers (*A. solstitialis*), die in der Umgebung von Darmstadt gefunden wurden, isoliert. Zwei weitere Stämme (MB1 und MB2) konnten im Rahmen dieser Arbeit aus Larven des Feldmaikäfers im Kaiserstuhl bei Bischoffingen isoliert werden; die molekulare Charakterisierung bestätigte die Artzugehörigkeit (MB1 ging später aufgrund einer Überhitzung wegen eines technischen Defekts im Brutschrank verloren, genomische DNA wurde jedoch schon vor dem Verlust gewonnen; eine eingehende Diskussion folgt im Kapitel 4.7).

Bei diesem Nachweis handelt es sich um den seltenen Nachweis einer Infektion von Larven des Feldmaikäfers (*M. melolontha*) durch *H. bacteriophora* unter natürlichen Verhältnissen (Berner & Schnetter, 2002a; diese Publikation siehe Anhang).

Im Biotest zeigte der Stamm MB2 nach Vermehrung in *Galleria*-Larven eine mittlere, nach 1-2 Wirtspassagen in *M. melolontha*-Larven eine relativ hohe Wirksamkeit gegenüber L3-Larven (vgl. Kapitel 4.5 über Selektion). Ein weiterer in dieser Arbeit untersuchter Stamm ist IH127 aus Italien. Er wurde ebenfalls aus Larven des Feldmaikäfers isoliert (Peters, 2002; pers. Mitteilung), zeigte aber im Biotest nur eine sehr geringe Wirkung. Dieser Stamm wird schon längere Zeit im Labor gehalten und hat möglicherweise seine Infektiosität verloren.

Mögliche Gründe für den Verlust der Infektiosität werden im Kapitel über die Steigerung der Infektiosität durch Selektion erläutert (4.5).

4.1.4 Generalisten oder Spezialisten? Vergleich *H. bacteriophora* und *H. megidis*

Die bisherigen Nachweise von *H. bacteriophora* aus Insekten (Coleoptera: Scarabaeidae, Chrysomelidae, Curculionidae; Lepidoptera: Noctuidae, Pyralidae) lassen vermuten, dass die Art eher zu den Generalisten zu rechnen ist; es sind insgesamt Nachweise von 10 Insektenarten aus 5 Familien und 2 Ordnungen bekannt (Koppenhöfer, 2001; pers. Mitteilung). Die Art *H. megidis* wurde hauptsächlich aus Scarabaeiden-Larven (3 Nachweise) und aus Larven des Dickmaulrüblers (*O. sulcatus*) isoliert (Peters, 1996). Diese Belege deuten eine Spezialisierung der Art auf Scarabaeiden-Larven an. Die Zahl der Freilandnachweise entomopathogener Nematoden direkt aus Insektenlarven ist jedoch vergleichsweise gering, so dass die daraus abgeleiteten Zuordnungen (Verallgemeinerungen) zu 'Generalisten' bzw. 'Spezialisten' nur vorbehaltlich sein können (vgl. Ehlers & Peters, 1994). Am ehesten ist der Ausdruck 'Spezialist' bei der oben besprochenen Art *S. glaseri* gerechtfertigt.

Die Arten *H. marelatus* und *H. megidis* erreichten vergleichbare Wirksamkeiten wie *H. bacteriophora*. Auffallend ist die Wirksamkeit von immerhin 30% gegen Larven des Junikäfers (Tab. 3.1) bei dem kommerziellen Stamm HW79 (Andermatt; vgl. Tab. 2.3) der Art *H. megidis*. Der Stamm NLH wurde wie die beiden oben erwähnten *H. bacteriophora*-Stämme aus Larven des Junikäfers isoliert, zeigte aber im Biotest kaum Wirkung. Anbetracht der vergleichsweise häufigen Nachweise von natürlichen Infektionen durch entomopathogene Nematoden beim Junikäfer (siehe Peters, 1996 und Glare *et al.*, 1993) ließe sich eine höhere Anfälligkeit dieser Art ableiten; die Biotests ergaben jedoch eher ein gegenteiliges Ergebnis. Auch der Umkehrschluss, dass ein *Heterorhabditis*-Stamm gegenüber der Insektenart (hier der Junikäfer), aus der er isoliert wurde, eine höhere Infektiosität zeigt (dass also eine Spezifität vorliegt), trifft offenbar nicht zu.

4.1.5 Der Feld- und der Waldmaikäfer sind unterschiedlich anfällig

Beim Vergleich der im Biotest erreichten Mortalitäten eines Nematoden-Stammes bei Larven des Feld- und Waldmaikäfers, des Junikäfers, des Mehlkäfers und der Großen Wachsmotte konnte keine Korrelation festgestellt werden, d.h. die Wirksamkeit eines Stammes gegen eine bestimmte Insektenart lässt keine oder nur sehr bedingt Aussagen über dessen Wirksamkeit bei einer anderen Insektenart zu, selbst wenn diese sehr nahe verwandt ist. Ein deutlicher

Zusammenhang scheint jedoch zwischen der Qualität einer Nematoden-Charge und dessen Wirksamkeit zu bestehen, d.h. eine bessere Nematoden-Charge wirkt bei verschiedenen Insektenarten jeweils besser (vgl. Abschnitt 4.5.8).

Besonders auffällig war die im Vergleich zum Feldmaikäfer deutlich geringere Anfälligkeit von Larven des Waldmaikäfers gegenüber fast allen getesteten Nematoden-Stämmen (Tab. 3.1). Ähnliche Befunde erhielt Peters (1994) beim Vergleich der Anfälligkeit der nahe verwandten Wiesenschnakenarten *Tipula oleracea* und *T. paludosa* gegen verschiedene *S. feltiae*-Stämme (*T. paludosa* war gegen fast alle Stämme anfälliger).

Die Gründe für die unterschiedliche Anfälligkeit dieser nahe verwandten Insektenarten bleiben unklar. Kleine Unterschiede im Verhalten, in morphologischen Strukturen, der Physiologie (z.B. Darmmilieu) und natürlichen Bakterienflora von Insektenarten können sich auf deren Anfälligkeit für EPN auswirken (Gaugler, 1988).

4.1.6 Die Problematik der Nachweismethode entomopathogener Nematoden

Die notwendige Suche (vgl. Abschnitt 4.1.1) nach weiteren Nematoden-Stämmen setzt eine sichere Nachweismethode voraus, die alle vorkommenden Arten erfasst. In den meisten Studien zum natürlichen Vorkommen entomopathogener Nematoden im Boden wurde eine von Bedding & Akhurst (1975) entwickelte Ködermethode mit *Galleria*-Larven angewandt (engl. *Galleria baiting technique*) (z.B. Akhurst & Brooks, 1984; Kleespies *et al.*, 1989; Vänninen *et al.*, 1989; Hominick & Briscoe, 1990a,b). Mit dieser Methode lassen sich jedoch nicht alle in einer Bodenprobe enthaltenen EPN nachweisen (z.B. Hominick *et al.*, 2001). Einige EPN reagieren nicht oder vergleichsweise gering auf *Galleria*-Larven, so z.B. die Art *S. intermedium*, die die dritthäufigste *Steinernema*-Art (nach *S. affinis* und einer noch unbeschriebenen Art) im gesamten Bundesgebiet war. Der Nachweis wurde anhand von Bodenproben unter Verwendung mehrerer Extraktionsmethoden erbracht (Sturhan, 1996; Ehlers, 1999; pers. Mitteilung). Die Ergebnisse des Nachweises einzelner Arten mit der Ködermethode scheinen jedoch starken Schwankungen zu unterliegen. So konnten Sturhan & Mráček (2001) *S. intermedium* mit der Ködermethode sehr wohl nachweisen. Verantwortlich für diese Schwankungen könnten jahreszeitlich bedingte Unterschiede im Vorkommen (Dichte der Nematoden, Tiefe des Vorkommens im Boden) und der Infektiosität der Nematoden (z.B. physiologischer Zustand der Dauerlarven), unterschiedliche Wirtspräferenzen oder Wirtsspezifitäten einzelner Arten sowie das Vorkommen weiterer Arten von EPN und anderer Nematoden in der gleichen Bodenprobe (Konkurrenz) sein. Rio & Cameron (2000) konnten mit der Ködermethode von Bodenproben im Frühjahr in etwa

80% *H. bacteriophora* nachweisen, während am gleichen Standort im Winter kein Nachweis gelang. Coosemans & Van den Bergh (2001) konnten mit der Ködermethode aufgrund starker Konkurrenz durch andere Nematodenarten, unter denen auch fakultativ parasitäre Arten waren, überhaupt keine EPN nachweisen, während eine Dekantiermethode in 30% der Proben einen Nachweis erbrachte. In einem direkten Vergleich der *Galleria*-Ködermethode mit einer Extraktionsmethode (Sieb- und Dekantiermethode in Verbindung mit dem Baermann-Tunnel) konnten Sturhan & Mráček (2001) eine deutlich erhöhte Effizienz der Extraktionsmethode nachweisen. Koppenhöfer (2001; pers. Mitteilung) konnte das oben erwähnte neue *Steinernema*-Isolat („*S. scarabaei*“) nur durch Köderung und ausschließliche Vermehrung in Scarabaeiden-Larven erhalten; eine Vermehrung und Köderung dieser Nematoden in *Galleria*-Larven scheint nicht möglich. Ähnliches gilt für die oben erwähnte Art *S. kushidai* (Koppenhöfer, 2001; pers. Mitteilung).

Diese Befunde machen deutlich, dass Studien, die auf der Ködermethode mit *Galleria*-Larven beruhen, in Bezug auf das Vorkommen von EPN nur sehr bedingt die tatsächlichen Gegebenheiten wiedergeben. Die Erweiterung der Nachweismethoden durch den Einsatz weiterer Insektenarten als Köder und von Extraktionsverfahren, wie Dekantier- und Siebmethoden sowie dem Baermann-Tunnel, ist daher eine starke Zunahme der Isolierung neuer Arten und Stämme entomopathogener Nematoden zu erwarten.

Die Notwendigkeit einer sicheren, schnellen Differenzierung und Zuordnung neuer Isolate war auch ein Grund für die Anwendung der ISSR-PCR-Methode zur molekularen Charakterisierung der Nematoden (vgl. Kapitel 3.7 und 4.7).

4.2 Wirksamkeit der Nematoden bei Rickettsien-Befall der Engerlinge

Insekten unter Stressbedingungen sind anfälliger gegenüber Pathogenen (Steinhaus, 1958). Als Stressbedingungen können z.B. künstliche Haltungsbedingungen, hohe Populationsdichten oder die latente Infektion mit einem weiteren Pathogen angesehen werden. Aufgrund der vergleichsweise geringen Empfindlichkeit von *Melolontha*-Larven gegenüber entomopathogenen Nematoden sollte daher untersucht werden, ob eine Infektion der Larven durch Rickettsien deren Anfälligkeit für einen Nematodenbefall erhöht. Eine latente Vorinfektion der Engerlinge kann auch bei Freilandversuchen einen Einfluss auf die Wirksamkeit von EPN haben.

Bei den Rickettsien ist es, da sie sich ausschließlich *in vivo* vermehren, durchaus denkbar, dass sie neben den symbiotischen Bakterien von den Nematoden übertragen werden und eine höhere Infektiosität vortäuschen. Es sollte daher auch untersucht werden, ob die Rickettsien durch die Nematoden übertragen werden können.

Die Versuche wurden mit Larven einer Engerling-Population des Waldmaikäfers durchgeführt, die zu 38% durch Rickettsien befallen waren. Bei der Rickettsien-Art handelt es sich um *Rickettsiella popilliae* (bzw. als eigene Art oder Unterart *R. melolonthae*; Tanada & Kaya, 1993). *Rickettsiella* zählt zu den Wolbachiae (Rickettsiales) die nach neuesten 16S rRNA-Vergleichen zu der Alpha-Gruppe innerhalb der Proteobakterien gerechnet werden (Fournier *et al.*, 1998).

4.2.1 Die Vorinfektion durch Rickettsien erhöhte die Wirksamkeit der Nematoden

Die Ergebnisse konnten belegen, dass die Rickettsien-Infektion von *M. hippocastani*-Larven (L2 und L3) deren Anfälligkeit für eine Infektion durch *H. bacteriophora* im Vergleich zu gesunden Larven um den Faktor 3-6 erhöht (Abb. 3.1 und 3.2 A). Von synergistischen Wirkungen bei gleichzeitiger oder zeitlich aufeinanderfolgender Applikation von *Bacillus thuringiensis japonensis* Stamm Buibui und den Nematoden *H. bacteriophora* oder *S. glaseri* bei Larven von *Cyclocephala hirta* und *C. pasadenae* (Scarabaeidae) berichten Koppenhöfer & Kaya (1997). Die höchste Anfälligkeit der Larven gegenüber diesen Nematoden wurde erreicht, wenn die Bakterien mindestens sieben Tage vor den Nematoden appliziert wurden. Eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen durch den Pilz *Beauveria brongniartii* konnten Ferron *et al.* (1969) bei *M. melolontha*-Larven, die mit *Paenibacillus popilliae* (alter Name: *Bacillus popilliae*) infiziert waren, feststellen.

Thurston *et al.* (1993) stellten eine 5-10fach erhöhte Anfälligkeit bei Larven von *Cyclocephala hirta* (Scarabaeidae), die mit *P. popilliae* infiziert waren, fest: Der LD₅₀-Wert für *H. bacteriophora* reduzierte sich von etwa 48 auf 4 Nematoden pro Larve. In eigenen Arbeiten konnte eine erhöhte Anfälligkeit von Larven des Junikäfers, die mit *B. popilliae* infiziert waren, gegenüber *H. megidis* beobachtet werden (Berner, 1998; unveröffentlicht).

Diese Studien und die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Vorinfektion durch ein Pathogen die Anfälligkeit der Käferlarven für ein weiteres Pathogen bzw. für einen Nematodenbefall deutlich erhöht. Der Effekt scheint noch ausgeprägter zu sein, wenn sich die Vorinfektion in der Larve bereits etabliert hat. Unklar bleibt allerdings, auf welchen Mechanismen die höhere Anfälligkeit für Nematoden beruht. Koppenhöfer & Kaya (1997) vermuten, dass der durch *Bacillus thuringiensis* verursachte Angriff auf das Mitteldarmepithel die Homöostase des Darmmilieus verändert (allerdings ein schwächerer Effekt wie in anderen Insekten) und dadurch die natürlichen Abwehrmechanismen der Larve beeinflusst werden. Ein bekanntes Phänomen bei Rickettsien-infizierten *Melolontha*-Larven unter Freilandbedingungen ist, dass sie bei sinkenden Außentemperaturen nach oben wandern, währenddessen gesunde Larven in tiefere (wärmere) Bodenschichten abtauchen (Krieg, 1971). Neben dieser Verhaltensabweichung ist auch die Mobilität der Larven im Vergleich zu gesunden deutlich reduziert; dieser Effekt wird mit dem durch die Rickettsien beschädigten Nervensystem der Larven erklärt (Krieg, 1971). Während das erwähnte Wandern nach oben im künstlichen Testsystem kaum eine Rolle spielen dürfte, könnte eine geringere Beweglichkeit und eine reduzierte Reaktionsfähigkeit der kranken Larven auf Außenreize, z.B. beim Eindringen von Nematoden, für die erhöhte Anfälligkeit verantwortlich sein. Eine schnellere und effektivere Penetration der Mitteldarmwand durch die Nematoden (*in vitro*) konnten Thurston *et al.* (1993) bei *C. hirta*, die mit *P. popilliae* infiziert waren, beobachten.

4.2.2 Die Reproduktionsrate der Nematoden wurde durch die Konkurrenz der Rickettsien reduziert

In den mit Rickettsien infizierten Larven konnte eine deutliche Reduzierung der Reproduktionsrate von *H. bacteriophora* nachgewiesen werden (Abb. 3.3 B). Im Gegensatz zu diesem Befund konnten Thurston *et al.* (1993) zeigen, dass zwischen der Reproduktionsrate der Nematoden in mit dem Bakterium *P. popilliae* infizierten und gesunden Larven kein Unterschied bestand. Diese Unterschiede lassen daher auf eine stärker ausgeprägte Konkurrenz, z.B. bei der Ressourcen-Nutzung innerhalb der Larve, zwischen dem *H. bacteriophora* Nematoden-Bakterien-Komplex und den Rickettsien als zwischen dem

Nematoden-Bakterien-Komplex und *P. popilliae* schließen. Auch Bednarek (1986) konnte eine reduzierte Vermehrung von *S. feltiae* in Schwammspinner-Larven (*Lymantria dispar*), die gleichzeitig mit Kernpolyederviren oder *Bacillus thuringiensis* infiziert waren, beobachten. Kaya & Burlando (1989) stellten bei mit *Bacillus thuringiensis* infizierten Larven des Maulbeerspinners (*Bombyx mori*) und der Gemüseeule (*Spodoptera exigua*) eine deutliche Reduzierung der Vermehrung von *S. feltiae* fest, während die gleichzeitige Infektion mit Kernpolyederviren bei 68% der Larven zu einer erfolgreichen Vermehrung der Nematoden führte.

Barbercheck & Kaya (1990) konnten in Bezug auf die Wirksamkeit einen synergistischen und in Bezug auf die Vermehrung einen vollständig antagonistischen Effekt des entomopathogenen Pilzes *Beauveria bassiana* und dem Nematoden *S. feltiae* nachweisen; der Gegenspieler, welcher einen zeitlichen Vorsprung erhielt, konnte sich im Insekt durchsetzen. Eigene Beobachtungen während der zahlreichen Biotests mit Nematoden bestätigen dies: Bei *Melolontha*-Larven, die durch den Pilz *B. brongniartii* infiziert waren, konnte niemals eine Nematodenvermehrung nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Interaktion zweier Pathogene in einem Wirt stark von der Art der Pathogene abhängt.

4.2.3 Die Fitness („Qualität“) der Nematoden nach Vermehrung in einer Larve mit Rickettsien-Infektion ist vermindert

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Nematoden, die sich in mit Rickettsien befallenen *Melolontha*-Larven vermehrt hatten, eine deutlich verminderte Wirksamkeit im Biotest hatten als Nematoden aus gesunden Larven (Abb. 3.3 B). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass durch die Rickettsien die symbiotischen Interaktionen zwischen Nematode und Bakterium beeinträchtigt sind, z.B. resultierend in weniger eingelagerten symbiotischen Bakterien pro Dauerlarve. Die intensive Nutzung des Fett-Eiweiß-Körpers der Insektenlarve durch die Rickettsien (siehe Abschnitt 4.2.4) könnte ein Grund für die verminderte Vermehrung von *H. bacteriophora* in kranken Larven sein. Für ihre Entwicklung benötigen die Nematoden bestimmte Fettsäuren in ausreichender Menge; die Menge an eingelagerten Fetten ist daher ein wichtiges und relativ einfach (z.B. visuell) zu bestimmendes Kriterium für die Qualität einer Dauerlarve (Patel *et al.*, 1997; Jung, 1999). Die verminderte Wirksamkeit der Nematoden, die sich in kranken Larven vermehrt hatten, könnte daher auf einem verminderten Fettdepot der Dauerlarven beruhen; dieser Aspekt wurde bisher jedoch nicht näher untersucht. Denkbar sind neben den quantitativen auch qualitative Veränderungen der zur Verfügung stehenden Fettsäuren in den von Rickettsien befallenen Larven. Die

Bedeutung des Fettdepots der Dauerlarven wird später noch ausführlicher besprochen (Abschnitt 4.5.11 und 4.5.12).

4.2.4 Eine Verschleppung der Rickettsien durch die Nematoden ist möglich, zu einer Rickettsien-Infektion kam es jedoch nicht

Die Pathogenese der Rickettsien bei *Melolontha*-Larven ist extrem langsam; Symptome der als „Lorscher Krankheit“ (Niklas, 1960) bekannten Infektion (weißlich-blaue bis weißlich-grüne Verfärbung des Körpers der Larve) treten etwa 2-3 Monate und der Tod der Larven erst 4-6 Monate nach oraler Infektion auf (Krieg, 1971; Jackson & Glare, 1992; Tanada & Kaya, 1993). Die Hämolymphe einer infizierten Larve ist im Endstadium der Krankheit vollständig durch die Rickettsien ausgefüllt. Die Verfütterung eines Homogenats einer kranken Larve führte in 60% der gefütterten gesunden Larven zur Ausprägung der typischen Symptome (vgl. Abb. 3.3 A). Rickettsien entwickeln sich in der Regel intrazellulär, eine Vermehrung ist daher nur *in vivo* oder in Zellkulturen möglich. Die Verfütterung eines Homogenats einer kranken Larve ist ein bewährtes Verfahren um gesunde Larven zu infizieren und dadurch die Rickettsien zu „kultivieren“ (Krieg, 1963, 1971). Die Infektion durch Rickettsien erfolgt in der Regel durch orale Aufnahme der ‚Infektionsform‘, die dann das Mitteldarmepithel penetriert. Darüber hinaus ist auch eine vertikale Transmission von infizierten Eltern auf die Nachkommen, z.B. beim Junikäfer, bekannt (Krieg, 1971). Die Vermehrung der Rickettsien innerhalb der Larve erfolgt intrazellulär und bevorzugt in Zellen des Fett-Eiweiß-Körpers; nach einigen Vermehrungszyklen findet man sie in zunehmendem Maß frei in der Hämolymphe.

Durch Verfütterung eines Homogenats aus oberflächensterilisierten Nematoden, die sich in kranken Larven vermehrt hatten, an gesunde *M. melolontha*-Larven (L3) konnten bei 20% der Larven nach 70 Tagen die typischen Symptome einer Rickettsien-Infektion nachgewiesen werden. Die Nematoden scheinen also genügend Rickettsien zu enthalten, um auf diese Weise eine Infektion auslösen zu können. Die orale Aufnahme und die anschließende Penetration der Mitteldarmwand entspricht dem natürlichen Infektionsweg der Rickettsien (Krieg, 1971), während die symbiotischen Bakterien, die sich ebenfalls im Homogenat befanden, die Darmwand nicht penetrieren können und vermutlich durch die aggressiven Bedingungen des Darmmilieus abgetötet werden; unter normalen Umständen gelangen sie über die Dauerlarve als Vektor direkt in das Hämocoel eines Insekts. Bei Versuchen, in denen hohe Dosierungen der symbiotischen Bakterien der Nematoden an *Melolontha*-Larven verfüttert wurden, führten in keinem Fall zu einer Infektion (Berner, 1998; unveröffentlicht).

Kaya & Burlando (1989) konnten durch Verfütterung ganzer oder homogenisierter Dauerlarven von *S. feltiae*, die sich in mit Kernpolyederviren infizierten *Spodoptera*-Larven vermehrt hatten, die Auslösung einer Vireninfektion in gesunden Larven beobachten: in 44% der Larven nach Verfütterung ganzer und in 58% nach Verfütterung homogenisierter Dauerlarven.

Im Gegensatz hierzu konnte bei externer Applikation der Nematoden aus kranken Larven keine Rickettsien-Infektion ausgelöst werden. Die Rickettsien waren nur in geringer Konzentration in der Hämolymphe der durch die Nematoden befallenen Larven nachzuweisen. Dieses Ergebnis lässt sich durch die extrem langsame Pathogenese der Rickettsien erklären (siehe oben). Die „mitgeschleppten“ Rickettsien werden in den Nematoden-befallenen Larven wahrscheinlich durch die sich schnell vermehrenden symbiotischen Bakterien überwachsen und in ihrer eigenen Vermehrung unterdrückt, da der Nematoden-Bakterien-Komplex eine vergleichsweise schnelle Pathogenese hat.

Bei Versuchen mit gleichzeitigen Infektionen von Rickettsien, Viren (*Vagoiavirus melolonthae*) und *Bacillus popilliae* an Larven von *M. melolontha* kam es nach hämocoelaler Injektion von jeweils zwei der Pathogene zu einer simultanen Entwicklung (Hurpin & Robert, 1968). Lediglich bei oral verabreichten Suspensionen mit Rickettsien und *P. popilliae* dominierten die Rickettsien. Die Autoren begründen dies mit der effizienteren Penetration des Mitteldarmepithels durch die Rickettsien. Dieser Befund macht deutlich, dass die Applikationsart die Durchsetzung eines Pathogens beeinflussen kann; das Pathogen mit der höheren Effizienz für den geforderten Infektionsweg setzt sich durch.

Über den Aufenthaltsort der Rickettsien innerhalb einer Dauerlarve (in welchen Geweben sind sie angesiedelt?) und die direkten Auswirkungen der Rickettsien auf die Nematoden (findet eine Vermehrung der Rickettsien im Nematoden statt?) können keine Aussagen gemacht werden. Da ein Zusammentreffen von Rickettsien und EPN unter natürlichen Bedingungen durchaus möglich ist, wäre die weitere Untersuchung dieser Aspekte interessant und könnte insbesondere Fragen im Zusammenhang mit der Ausbreitungsbiologie der Rickettsien klären. Zahlreiche Insekten enthalten symbiotische und auch pathogene Wolbachien (die Übergänge sind fließend), die den Rickettsien sehr nahe stehen. Aus Filarien sind symbiotische Wolbachien bekannt, die vorwiegend in den Fortpflanzungsorganen der Nematoden angesiedelt sind. Werden die Filarien mit dem Antibiotikum Tetracyclin behandelt, das die Wolbachien unterdrückt, können sie sich nicht mehr vom L3 zum L4-Stadium häuten (Smith & Rajan, 2000). Wolbachien aus EPN sind bisher jedoch noch nicht bekannt.

4.3 Infektionsbiologie I – LD₅₀-Bestimmungen

Die vergleichenden Untersuchungen zur Infektionsbiologie auf verschiedenen Stufen des Infektionsprozesses ergaben für die beiden Nematodenarten *H. bacteriophora* und *S. glaseri* ein recht unterschiedliches Bild. Die Betrachtungen der folgenden Abschnitte konzentrieren sich daher auf den Vergleich der beiden Nematodenarten. Untersucht wurde die Wirkung der Nematoden nach externer Applikation bis hin zur Wirkung der symbiotischen Bakterien bei haemocoaler Injektion. Durch entsprechende Konzentrationsreihen wurden jeweils die LD₅₀-Werte bestimmt.

Die Besprechung der Penetrationsroute und des Infektionsverhaltens einschließlich der Modelle zur Beschreibung der Befallsstrategien folgt im Kapitel 4.4.

Der Einfluss der Selektion (Selektionslinien H1-14 und S2-10) und des Vermehrungswirts der Nematoden auf die Wirksamkeit und damit die LD₅₀-Werte werden im Kapitel 4.5 behandelt.

4.3.1 Vergleich der Modelle zur LD₅₀-Bestimmung

Für die LD₅₀-Bestimmungen wurde die Probit-Analyse und die Gleichung von Peto (1953) verwendet. Signifikante Abweichungen von den Modelldaten innerhalb einer Probit-Analyse beruhen auf stark voneinander abweichenden Dosis-Wirkungskurven. In solchen Fällen wurden die Biotest-Daten in Rubriken zusammengefasst, innerhalb derer die Übereinstimmung mit den Modellvorhersagen gewährleistet war. Dies war bei den externen Applikationen zwischen *H. bacteriophora* und *S. glaseri* bei den *M. melolontha*-L2-Larven und den *Tenebrio*-Larven der Fall (Tab. 3.2).

Das Modell nach Peto (1953) war bei allen Daten aus den Versuchen mit *Tenebrio*-Larven weniger gut geeignet.

Bei externer Applikation der Nematoden bei *M. melolontha*-L3-Larven war eine Übereinstimmung mit dem Probit-Modell gegeben (vgl. Tab. 3.2). Eine eigene Probit-Analyse für alle Daten aus der Kombination *H.b./M.m.*-L3 ergab jedoch im Gegensatz zu der Kombination aus *S.g./M.m.*-L3 eine signifikante Abweichung zu den Modelldaten. Dies könnte an dem nahezu linearen Verlauf der Dosis-Wirkungskurve bei *H. bacteriophora* liegen. In einem solchen Fall ist davon auszugehen, dass keine dem Modell entsprechende kooperative Wirkung (= logarithmische Zunahme) mit zunehmender Dosis gegeben war (vgl. Huber & Hughes, 1984). Dieser Befund deutet daher darauf hin, dass bei externer Applikation *H. bacteriophora* stärker als „Einzelkämpfer“ operiert als *S. glaseri*; dies wurde in weiteren Versuchen der vorliegenden Arbeit mehrfach bestätigt (vgl. Kapitel 4.4).

Die gute Übereinstimmung beider Modelldaten mit den Biotest-Daten bei der oralen und hämocoelen Injektion von Nematoden belegt, dass die Wirkung des Nematoden-Bakterien-Komplexes sich im Inneren des Insekts potenziert.

Für die Injektion der symbiotischen Bakterien von *H. bacteriophora* war das Probit-Modell besser als das von Peto geeignet. Bei den symbiotischen Bakterien von *S. glaseri* wichen jedoch die Daten beider Modelle signifikant von den Versuchsdaten ab. Das beweist, dass diese Bakterien kaum pathogen wirken (vgl. Abschnitt 4.3.4).

4.3.2 Die LD₅₀ bei externer Applikation und oraler Injektion der Nematoden ist bei *H. bacteriophora* sehr viel größer als bei *S. glaseri*

Sowohl bei externer Applikation als auch nach oraler Injektion der Nematoden sind die LD₅₀-Werte bei *S. glaseri* um den Faktor 12 bzw. 3 kleiner (vgl. Tab. 3.2 und 3.4) als bei *H. bacteriophora*. Wie bereits im Ergebnisteil erwähnt, lässt sich daraus ableiten, dass *H. bacteriophora* weniger gut in *M. melolontha*-Larven penetrieren kann. Die geringe Wirkung von *H. bacteriophora* nach oraler Injektion ist ein Hinweis dafür, dass die Nematoden Schwierigkeiten haben, die Darmwand zu durchdringen und/oder den aggressiven Bedingungen des Darmmilieus zu widerstehen. Letzteres konnte bei *in vitro* Versuchen bestätigt werden (vgl. Abschnitt 4.4.7). Die in vorliegender Arbeit ermittelten LD₅₀-Werte für L3-Larven von *M. melolontha* bei oraler Injektion sind etwa 80 Dauerlarven bei *H. bacteriophora* (HYB) und 25 bei *S. glaseri* (NC). Peters (2000a) erhielt ein vergleichbares Ergebnis nach oraler Injektion von 20 Dauerlarven bei L2-Larven; bei *H. bacteriophora* (NJ) wurden 20% und bei *S. glaseri* (RS92) > 60% infiziert. Die etwas höhere Mortalität deutet auf eine höhere Empfindlichkeit der L2-Larven hin. Wang & Gaugler (1998) stellten fest, dass nach oraler Injektion von *H. bacteriophora* in *P. japonica*-Larven tatsächlich nur ein sehr kleiner Anteil der Dauerlarven durch die Darmwand in das Hämocoel penetriert: bei 40 injizierten DL waren es etwa 0,5 DL, also 1,4%. Im Gegensatz hierzu penetrierte bei *S. glaseri* bei allen Dosierungen stets ein wesentlich höherer Anteil der Dauerlarven: bei 40 injizierten DL waren es etwa 14 DL, also 35%. Forschler & Gardner (1991) untersuchten die Zeit, welche die Dauerlarven für die Penetration der Mitteldarmwand *in vitro* benötigten. Bei *H. heliothidis* war diese Zeit im Vergleich zu *S. carpocapsae* sowohl bei Mitteldärmen von *Galleria*- als auch von *Phyllophaga hirticula*-Larven kürzer (vgl. Abschnitt 4.4.2).

Bei *S. glaseri* konnten AbuHatab *et al.* (1995) nachweisen, dass die Dauerlarven während der aktiven, mechanischen Penetration der Darmwand proteolytische Enzyme abgaben. Diese Enzyme dürften den Dauerlarven das Durchdringen der Darmwand erleichtern.

4.3.3 Die LD₅₀ bei hämocoaler Injektion der Nematoden und der symbiotischen Bakterien ist bei *H. bacteriophora* sehr viel kleiner als bei *S. glaseri*

Sowohl bei hämocoaler Injektion der Nematoden als auch der symbiotischen Bakterien waren die LD₅₀-Werte bei *H. bacteriophora* sehr viel kleiner, etwa um den Faktor 17 bzw. 30, als bei *S. glaseri* (Tab. 3.4 und 3.5). Die niedrige LD₅₀ von 1-3 Dauerlarven bei hämocoaler Injektion der Nematoden bei *H. bacteriophora* (bei *S. glaseri*: 16-50) beruht demnach in erster Linie auf der hohen Virulenz der symbiotischen Bakterien.

Bei der Injektion von Dauerlarven von *Heterorhabditis* in das Hämocoel von *Phyllopertha horticola* erhielten Smits (1992) und Sulistyanto (1997) übereinstimmende Ergebnisse mit der vorliegenden Arbeit; die LD₅₀ lag im Bereich von 1-3 Nematoden. Für Larven von *A. solstitialis* dagegen war selbst nach Injektion von bis zu 16 Dauerlarven keine erhöhte Mortalität festzustellen (Smits, 1992). Dieses Ergebnis könnte daher ein Hinweis darauf sein, dass die auch in vorliegender Arbeit bestätigte geringe Anfälligkeit von *A. solstitialis*-Larven auf deren ausgeprägteren Immunreaktion basiert.

Peters (2000a) berichtet von einer Mortalität von 45-100% nach Injektion von 1-10 Dauerlarven von *H. bacteriophora* (NJ) oder *S. glaseri* (RS92) in das Hämocoel von *M. melolontha*-Larven (L2). Bei *H. bacteriophora* stimmt dieses Ergebnis mit den in vorliegender Arbeit ermittelten Werten für L3-Larven überein. Die höhere Mortalität der L2-Larven nach Injektion von *S. glaseri* deutet auf eine höhere Empfindlichkeit der L2-Larven hin, die möglicherweise auf einer geringeren zellulären und humoralen Immunreaktion beruht (vgl. Abschnitt 4.4.8).

Tachibana *et al.* (1996) stellten unterschiedliche Mortalitäten nach hämocoaler Injektion von *S. kushidai* in Larven von *Anomala cuprea* fest. Enthielten die Dauerlarven symbiotische Bakterien wie im „Normalfall“ (Bakterien in Phase I; vgl. Abschnitt 4.5.13), so reichten bereits 5 Dauerlarven aus, um mehr als 60% der Larven abzutöten. Enthielten die Dauerlarven dagegen keine Bakterien, so waren 100 Dauerlarven notwendig, um die gleiche Wirkung zu erzielen. Dieses Ergebnis verdeutlicht die Bedeutung der symbiotischen Bakterien bei der hämocoalen Injektion der Nematoden.

4.3.4 Die Virulenz der symbiotischen Bakterien

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten LD₅₀-Werte nach hämocoaler Injektion von *P. luminescens* in *M. melolontha*-Larven (L3) liegen bei etwa 240 Bakterien (bei L2-Larven: 18) und für *X. poinarii* bei etwa 8000 Bakterien (Tab. 3.5) pro Larve und decken sich damit weitgehend mit den Angaben von Akhurst (1986) und Yeh & Alm (1992). Im Vergleich zu

Popillia japonica-Larven scheinen *M. melolontha*-Larven gegenüber *P. luminescens* etwas resistenter, gegenüber *X. poinarii* dagegen etwas empfindlicher zu sein. Dies kann jedoch anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht zweifelsfrei belegt werden, da die Kulturbedingungen der Bakterien vor der Injektion anders waren und andere Stämme verwendet wurden als in den zitierten Arbeiten.

Die symbiotischen Bakterien der Gattung *Photorhabdus* sind mit Nematoden der Gattung *Heterorhabditis* assoziiert. Diese Bakterien sind bei hämocoaler Injektion für eine Vielzahl von Insekten hoch virulent (Dunphy & Thurston, 1990). Griffin *et al.* (1989) berichten z.B. von LD₅₀-Werten von 0,9-5,5 Bakterien pro *Galleria*-Larve, Milstead (1979) von 1-2. Yeh & Alm (1992) konnten gegenüber *P. japonica* als auch *Galleria*-Larven eine LD₅₀ von 1-2 Bakterien pro Insekt ermitteln.

Im Gegensatz hierzu steht eine extrem geringe Virulenz der symbiotischen Bakterien von *S. glaseri*. Das Bakterium *Xenorhabdus poinarii* scheint in dieser Hinsicht eine Sonderstellung unter den mit EPN assoziierten Bakterienarten einzunehmen (Akhurst, 1986). Akhurst (1986) fand heraus, dass selbst nach hämocoaler Injektion von rund 1000 Bakterien pro *Galleria*-Larve nicht einmal die Hälfte der behandelten Larven starb, die LD₅₀ schätzte der Autor zwischen 1000 und 10000 Bakterien. Dagegen lag die LD₅₀ bei Injektion von *X. nematophilus* (symbiotisches Bakterium von *S. carpocapsae*) bei *Galleria*-Larven bei 1-3 und bei *P. japonica*-Larven bei etwa 25 Bakterien pro Larve (Yeh & Alm, 1992). Yeh & Alm (1992) fanden keinen Unterschied in der Wirkung von *X. poinarii* zwischen *P. japonica*- und *Galleria*-Larven, die LD₅₀ schätzten sie weitaus höher als 10000 Bakterien pro Larve. Da es bei einer solch hohen Anzahl injizierter Bakterien wahrscheinlich auch bei nicht pathogenen Bakterien bereits zu tödlichen Septikämien kommt, ist davon auszugehen, dass *X. poinarii* für sich allein kaum pathogen wirkt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und von Akhurst (1986) sowie Yeh & Alm (1992) verdeutlichen, dass *X. poinarii* nur in Kombination mit seinem Partner *S. glaseri* pathogen wirkt. Aus diesem Befund lässt sich schließen, dass die Dauerlarven selbst Faktoren beisteuern, die z.B. das Immunsystem des Wirts stören oder toxisch wirken. Götz *et al.* (1981) konnten bei *S. carpocapsae* die Abgabe von Immuninhibitoren nachweisen, die antibakterielle Proteine (in diesem Fall Cecropine) abbauen und dadurch die symbiotischen Bakterien vor deren Wirkung schützen. Simões *et al.* (2000) konnten eine Korrelation der Infektiosität verschiedener Stämme von *S. carpocapsae* mit deren Enzymaktivitätsmuster nachweisen. Bei weniger infektiösen Stämmen war z.B. die Esterase- und α -Mannosidase-Aktivität erheblich geringer.

Eigene Vorarbeiten (Berner, 1998; unveröffentlicht) als auch die Ergebnisse von Peters (2000a) weisen darauf hin, dass *M. melolontha*-Larven bei hämocoalen Injektionen sehr empfindlich reagieren. Die LD₅₀-Werte bei hämocoaler Injektion von Dauerlarven von *H. bacteriophora* liegen bei *M. melolontha*- und *Galleria*-Larven bei 1-6 Dauerlarven pro Insekt (diese Arbeit; Milstead, 1979; Griffin *et al.*, 1989). Bei externer Applikation liegt der LD₅₀-Wert bei *M. melolontha*-Larven bei etwa 5000 und bei *Galleria*-Larven bei < 20 Dauerlarven pro Insekt. Obwohl *Galleria*-Larven also weitaus anfälliger gegenüber *H. bacteriophora* sind, gibt es kaum Unterschiede zwischen den LD₅₀-Werten bei hämocoaler Injektion der Dauerlarven bzw. symbiotischen Bakterien.

4.3.5 Der hohe Anteil kleiner Kornfraktionen ($\varnothing < 20 \mu\text{m}$) im Bodensubstrat „Lehm“ dürfte für die reduzierte Wirksamkeit der Nematoden verantwortlich sein

Die LD₅₀-Werte nach externer Applikation waren für beide Nematodenarten im Bodensubstrat Lehm (= sandiger Schluff) geringer als in den beiden anderen getesteten Substraten Sand und „Standard“ (= schluffiger Sand; vgl. Tab. 2.5 und 3.2). Dieser Effekt war bei *S. glaseri* besonders ausgeprägt und signifikant. Als Erklärung für diese Beobachtung kommen in erster Linie die verschiedenen Anteile der Kornfraktionen in den drei Bodensubstraten in Betracht. Der Anteil der Kornfraktion mit einem Durchmesser < 20 μm (= Schluff- und Tonfraktion) war im Substrat „Lehm“ mit 36% mit Abstand am größten. Im Standard-Substrat (= schluffiger Sand) war der Anteil dieser Fraktion etwa 9% (Tab. 2.5). Besonders die Fraktionen der kleinen Körner dürfte die Mobilität der Nematoden durch die Bildung kleinerer Poren erheblich einschränken. Damit wird auch verständlich, dass die großen Dauerlarven von *S. glaseri* stärker beeinträchtigt werden als die wesentlich kleineren von *H. bacteriophora*. Die Bewegung in einem solch engporigem Substrat ist mit erhöhtem Energieverbrauch verbunden (vgl. Kaya, 1990).

Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen von Kaya (1990) überein. Nach diesem Autor ist nicht nur die Mobilität der Nematoden eingeschränkt, sondern auch das Überleben der Dauerlarven deutlich reduziert. So wurde z.B. die niedrigste Überlebensrate von *S. glaseri* in einem Vergleich von Ton, tonigem Lehm, Sand und sandigem Lehm im Ton gefunden, also der Bodenart mit dem höchsten Anteil der Fraktion kleinster Körner ($\varnothing < 20 \mu\text{m}$ bzw. < 2 μm ; vgl. Gisi *et al.*, 1997). Kaya (1990) vermutet als Erklärung für diese Beobachtungen die geringe Porengröße und die geringere Belüftung in den lehmig-tonigen Bodenarten.

Auch die Wirtsfindung ist in lehmig-tonigen Bodenarten beeinträchtigt (Kaya, 1990).

Diese Kenntnisse sind besonders im Hinblick auf Freilandapplikationen wertvoll. Die Bodenart kann neben weiteren abiotischen Faktoren (z.B. Feuchtigkeit) die Wirksamkeit der applizierten Nematoden erheblich reduzieren. Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Freilandversuche wurden beispielsweise auf Standorten mit lehmigen Böden durchgeführt (Berner & Schnetter, 2002a; siehe Anhang).

4.4 Infektionsbiologie II – Infektionsverhalten und Penetrationsroute

4.4.1 *H. bacteriophora* und *S. glaseri* sind Pirschjäger, ihre Wanderaktivität und Wirtsfindung unterscheiden sich jedoch deutlich

EPN suchen und finden ihre Wirte auf unterschiedliche Art und Weise. Je nach der überwiegenden Verhaltensweise der Dauerlarven innerhalb einer Art, werden einzelne Nematodenarten als „Ansitz- oder Lauerjäger“ (engl. *ambush foragers* oder '*sit-and-wait strategy*') oder als „Pirschjäger“ (engl. *cruise foragers* oder '*widely ranging strategy*') bezeichnet (z.B. Grewal *et al.*, 1994).

Obwohl *H. bacteriophora* und *S. glaseri* zu den Pirschjägern gezählt werden, offenbarten die Versuche zum Wanderverhalten und zur Wirtsfindung der Nematoden signifikante Unterschiede. Die Dauerlarven von *S. glaseri* verteilten sich auf den Agaroseplatten etwa um den Faktor 5 schneller (Abb. 3.5) und hatten in den Sandröhren einen wesentlich höheren Verteilungsgrad als die Dauerlarven von *H. bacteriophora* (Abb. 3.6).

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Grewal *et al.* (1994), die auf Agaroseplatten keinen Unterschied in der Verteilungsgeschwindigkeit zwischen den beiden Arten feststellen konnten. Die Diskrepanzen lassen sich wahrscheinlich auf geringe Unterschiede in der Versuchsgestaltung, auf die verwendeten Nematoden-Stämme und die Qualität (Vorbehandlung, Lagerzeit und -temperatur usw.) der Chargen zurückführen (vgl. z.B. Griffin, 1996; O'Leary *et al.*, 1998; siehe Abschnitt 4.5.1).

Dagegen berichten Lewis *et al.* (1995) bei vergleichbaren Versuchen mit beiden Nematodenarten auf Agaroseplatten ebenfalls von einer etwa um den Faktor 5 schnelleren Verteilung und einer um den Faktor 4 größeren Strecke pro Dauerlarve bei *S. glaseri*. Auch Kaya (1990) betont die hohe Wanderaktivität als besonderes Charakteristikum der Art *S. glaseri*.

Peters (1994) konnte nachweisen, dass bei *S. feltiae* eine Fernortung eines potentiellen Wirts weitgehend auszuschließen ist und daher das Finden eines Wirts aus der Ferne nur durch das zufällige (nicht orientierte) Umherwandern der Nematoden bestimmt wird. Erst im näheren

Bereich eines Insekts wird dieses erkannt und die Dauerlarven verbleiben in der Nähe und penetrieren. Demnach könnte die starke Aggregation von *S. glaseri* in und um die *Tenebrio*-Larven durch die größere Wanderaktivität dieser Art erklärt werden.

Bei *H. bacteriophora* kann jedoch das Ausbleiben einer Aggregation in den mit *Tenebrio*-Larven besetzten Abschnitten (Abb. 3.6) nur dadurch erklärt werden, dass für die Dauerlarven selbst im Nahbereich nur sehr schwache Reize von den *Tenebrio*-Larven ausgehen, so dass kaum ein gezielter Befall stattfindet. Die am meisten zutreffende Beschreibung der Verteilung von Nematoden in den *Tenebrio*-Larven mittels der Poisson-Verteilung bestätigte tatsächlich, dass der Befall bei niedrigen Nematoden-Dichten dem Zufall überlassen ist (vgl. Abschnitt 4.4.10).

Boff (2001) berichtet von positiven, neutralen und zum Teil sogar negativen Reaktionen (Wandern vom Insekt weg) bei Auswahlversuchen mit *H. megidis* bei Larven des Dickmaulrüsslers (*O. sulcatus*) und *Galleria*-Larven. Standen den *O. sulcatus*-Larven Wurzeln von Erdbeerpflanzen zur Verfügung, war die Reaktion der Nematoden positiv. Bei alleinigem Angebot der Larve oder beim Angebot von Larven ohne direkten Kontakt zu Wurzeln war die Reaktion neutral oder negativ. Die stärkere Reaktion der Nematoden bei gleichzeitigem Angebot von Wurzeln könnte auf deren Ausscheidung von CO₂ beruhen, welche bei angefressenen Wurzeln höher ist (Wang & Gaugler, 1998; Boff, 2001). Diese Befunde weisen darauf hin, dass Arten der Gattung *Heterorhabditis* weniger stark auf spezifische Wirtsreize reagieren.

Die Unterschiede beider Nematodenarten in der Wirtserkennung und der davon abhängigen Aggregation der Dauerlarven waren bei *M. melolontha*-Larven geringer als bei *Tenebrio*-Larven (Abb. 3.6). Daraus kann geschlossen werden, dass von *M. melolontha*-Larven intensivere und auf größere Distanz wirkende Reize ausgehen, auf die auch Dauerlarven von *H. bacteriophora* stärker reagieren.

Die Dauerlarven von EPN reagieren nachweislich auf CO₂, auf Darminhalte und Exkremente von Insekten und auch auf Temperaturgradienten, wobei die Arten unterschiedlich stark auf die verschiedenen Reize reagieren (Lewis *et al.*, 1992; Grewal *et al.*, 1993). Wang & Gaugler (1998) wiesen z.B. nach, dass Dauerlarven von *H. bacteriophora* stärker auf Darmsaft von *P. japonica*-Larven reagierten, während Dauerlarven von *S. glaseri* Hämolymphe bevorzugten.

Jung (1999) berichtet ebenfalls von relativ großen Unterschieden im Wanderverhalten der beiden als Pirschjäger bekannten Arten *H. bacteriophora* und *H. megidis*. Letztere wies eine deutlich höhere Wanderaktivität auf. Westerman (1997) begründet diesen Unterschied mit der unterschiedlichen Länge der Dauerlarven - Dauerlarven von *H. megidis* sind länger. Die

Größe der Dauerlarven korreliert meist positiv mit dem Umfang des Fettdepots (vgl. Abschnitt 4.5.11). Demnach können die Merkmale „lang“ und „großes Fettdepot“ als Anpassungserscheinungen für wanderaktives Verhalten angesehen werden. Das aktive Umherwandern und Suchen nach einem Wirt ist ein energieverbrauchendes Verhalten und die Hauptenergiereserve der Dauerlarve sind die eingelagerten Lipide (z.B. Selvan *et al.*, 1993b; vgl. Kapitel 4.5). Bei pflanzenparasitären Nematoden wie *Meloidogyne javanica* ist bekannt, dass die Dauerlarven für das Suchen einer geeigneten Pflanze und einer Einwanderungsstelle mehr Energie verbrauchen als für die eigentliche Penetration (van Gundy *et al.*, 1967). Dementsprechend wurde in einer vergleichenden Studie der niedrigste Energieverbrauch bei dem klassischen Anstanzjäger *S. carpocapsae* gefunden, während *S. glaseri* einen intermediären und *H. bacteriophora* den höchsten Energieverbrauch aufwies (Lewis *et al.*, 1995). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die großen Dauerlarven von *S. glaseri* das größte Fettdepot besitzen und daher auch nach längerer Zeit noch über relativ hohe Lipidreserven verfügen (Lewis *et al.*, 1995).

Die Wanderaktivität wird von einigen Autoren als Qualitätskriterium zur Beurteilung von Nematoden-Chargen vorgeschlagen, zumal sie mit der Infektiosität korreliert (Jung, 1999; vgl. Abschnitt 4.4.3).

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass Dauerlarven von *H. bacteriophora*, die aktiver wandern, in höherem Ausmaß in ein Insekt penetrieren (Daten nicht dargestellt, vgl. Abschnitt 3.4.1). Daraus lässt sich folgern, dass die Merkmale „Wanderaktivität“, „Penetrationsaktivität“ und „Infektiosität“ korrelieren (vgl. Abschnitt 4.4.3 und Kapitel 4.6). Um dies abzusichern, sind jedoch weitere und umfangreichere Untersuchungen notwendig.

4.4.2 Infektionsdynamik bei externer Applikation

Die Infektionsdynamik bei externer Applikation der Nematoden wurde über Parameterbestimmung mit zwei Modellen beschrieben. In den meisten Fällen wurde eine bessere Beschreibung der ermittelten Daten mit dem einfachen linearen Modell nach Bohan & Hominick (1995) erreicht (Tab. 3.6). Die Ermittlung der Penetrationsrate pro Zeiteinheit ($= \beta$) über eine Regressionsanalyse nach der Methode von Anderson (1978a,b) ergab Werte, die nur eine ungenügende Beschreibung der gefundenen Daten zuließ; diese Daten wurden daher nicht aufgeführt. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Annahme eines linearen Zusammenhangs zwischen der Anzahl penetrierter Nematoden und der Zahl applizierter Nematoden (Dosis) bei einem gegebenen Zeitpunkt nicht hinreichend erfüllt war.

Die Werte von α , die den Anteil infektiöser Nematoden wiedergeben, waren in allen bis auf einen Fall (*Tenebrio*-Larven in Testsystem I) bei *H. bacteriophora* deutlich kleiner als bei *S. glaseri* (Tab. 3.6). Aufgrund der großen Varianzen waren die Werte jedoch nur in wenigen Fällen signifikant verschieden, wie z.B. bei den *M. melolontha*-Larven (L3). Die ausgeprägte Nicht-Linearität ist ein Charakteristikum vieler Wirt-Parasit-Interaktionen (Anderson, 1978a,b). Westerman (1997) ermittelte bei *Galleria*-Larven für *Steinernema*-Arten einen relativ konstanten α -Wert von 30-50%, während er bei *Heterorhabditis* von 1-90% variierte. Demzufolge ist der Anteil infektiöser Dauerlarven bei *Heterorhabditis*-Arten größeren Schwankungen unterworfen. Die Ursachen für diese Fluktuationen und deren Folgen werden im nächsten Abschnitt (4.4.3) und im Kapitel 4.5 (Selektion) eingehender diskutiert.

Die Penetrationsrate pro Zeiteinheit belief sich für *H. bacteriophora* bei *Tenebrio*-Larven auf etwa 0,01 Nematoden pro Stunde und für *S. glaseri* auf etwa 0,07. Bei *M. melolontha*-Larven (L2) waren die entsprechenden Werte etwa 0,01-0,016 (*H.b.*) und 0,002-0,03 (*S.g.*) und bei L3-Larven 0,008 (*H.b.*) und 0,019 (*S.g.*) Nematoden pro Stunde (Tab. 3.6). In den meisten Fällen penetrierten also die Dauerlarven von *S. glaseri* schneller.

Westerman (1997) ermittelte über die Methode von Anderson (1978a,b) für *H. megidis* bei *Galleria*-Larven eine Penetrationsrate von 0,079 und bei *O. sulcatus*-Larven von 0,018 Nematoden pro Stunde.

Bei unmittelbarer Reizkonfrontation, wie sie z.B. im Testsystem II aufgrund des kleinen Behältnisses gegeben war, reagierten (penetrierten) die Dauerlarven beider Nematodenarten jedoch etwa gleich schnell, in einigen Fällen reagierte dann sogar *H. bacteriophora* schneller, z.B. bei *M. melolontha*-L2-Larven in Testsystem II (vgl. Abb. 3.7). Die Zahl penetrierter Dauerlarven war bei *H. bacteriophora* besonders nach kurzen Expositionszeiten etwas höher, blieb dann allerdings auf relativ niedrigem Niveau. Dagegen war bei *S. glaseri* in den ersten 24 Stunden die Penetration etwas zeitverzögert, stieg dann aber um so rasanter an (vgl. Abb. 3.7-3.9). Ähnliche Ergebnisse bei den beiden Nematodenarten fanden Wang *et al.* (1995) bei *P. japonica*-Larven. Forschler & Gardner (1991) stellten fest, dass Dauerlarven von *H. bacteriophora* im Vergleich zu *S. carpocapsae* bei *in vitro* Versuchen die Mitteldarmwand von Insekten schneller penetrierten. Demzufolge penetriert bei *H. bacteriophora* ein geringerer Anteil der Dauerlarven, ein Teil davon penetriert dafür aber sehr schnell.

Die symbiotischen Bakterien konnten *in vitro* und *in vivo* in fast allen Fällen bei *H. bacteriophora* früher (nach etwa 1-2 h *in vitro* und ≤ 24 h *in vivo*) in der Hämolymphe nachgewiesen werden als bei *S. glaseri* (etwa 6-10 h *in vitro* und 24-48 h *in vivo*; Abb. 3.7-3.9 und 3.23). Demnach penetrieren Dauerlarven von *H. bacteriophora* im Durchschnitt

langsamer, geben aber ihre Bakterien schneller frei. Dies wird plausibel, wenn die hohe Anfälligkeit der Dauerlarven dieser Nematodenart gegenüber dem Immunsystem der *M. melolontha*-Larven berücksichtigt wird (vgl. Abschnitt 4.4.7). Auch diese Ergebnisse stimmen weitgehend mit vergleichbaren Untersuchungen von Wang *et al.* (1995) an beiden Nematodenarten bei *P. japonica*-Larven überein.

4.4.3 Gibt es eine phasenweise Infektiosität der Dauerlarvenpopulation?

Einige Beobachtungen an EPN lassen darauf schließen, dass in einer Dauerlarvenpopulation zu einer gegebenen Zeit und unter den gegebenen Bedingungen jeweils nur ein bestimmter Anteil infektiös gegenüber einer bestimmten Insektenart ist (vgl. Bohan & Hominick, 1995).

Während der zahlreich durchgeführten Biotests für die vorliegende Arbeit, zeichnete sich ab, dass die Abschätzung dieses Anteils der Dauerlarvenpopulation und die Faktoren, die diesen Anteil bedingen und beeinflussen, ein zentrales Problemfeld in der Interpretation der durch die Nematoden verursachten Wirkung ist. Es soll daher in diesem Abschnitt versucht werden, mögliche Einflussfaktoren abzuleiten. Ein Vergleich mit detaillierteren (molekularen) Kenntnissen bei dem nahe verwandten *C. elegans* soll die Betrachtungen abrunden. Eine zusammenfassende Darstellung der Vergleiche ist in Abb. 4.1 dargestellt.

Nach mehrfachem Austausch der Wirtsinsekten, die im selben Behälter angeboten wurden, konnten bei *S. glaseri* nach 3-4 Zyklen die gesamte Dauerlarvenpopulation geködert werden (vgl. Abb. 3.13). Bei *H. bacteriophora* hingegen blieb die Penetrationsrate für längere Zeit nahezu konstant niedrig (bei *M. melolontha*-Larven) oder unterlag über längere Zeit hohen Fluktuationen mit abnehmender Tendenz (bei *Tenebrio*-Larven; Abb. 3.14).

In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, dass die Dauerlarven beider Nematodenarten mehr als 5 Wochen im Bodensubstrat überleben und dann nach Zugabe eines Wirts in nahezu dem gleichen Ausmaß reagierten (penetrierten), wie bei sofortiger Verfügbarkeit eines oder mehrerer Wirtsinsekten (Abschnitt 3.4.2.). Die Dauerlarven können also über längere Zeit im Bodensubstrat überdauern, ohne dass sich der Anteil infektiöser Dauerlarven ändert.

Diese Ergebnisse stimmen weitgehend mit den Ergebnissen von Campbell *et al.* (1999) überein. Diese Autoren führten ähnliche Versuche wie in der vorliegenden Arbeit durch. Die Köderung der Dauerlarven wurde zusätzlich bei verschiedenen Wirtsdichten (= *Galleria*-Larven) und bei Dauerlarven, die nach unterschiedlichen Tagen aus dem Insektenkadaver ausgewandert waren, verglichen. Für die *Steinernema*-Arten *S. carpocapsae* und *S. glaseri* konnten, insbesondere bei den höheren Wirtsdichten (> 10 *Galleria*-Larven), etwa 60% der

Dauerlarven nach 1-2 Austauschzyklen geködert werden. Bei *S. feltiae* waren es 30-50% und bei *H. bacteriophora* waren es selbst nach 6 Austauschzyklen weniger als 30%. Bohan & Hominick (1997a) konnten bei *S. feltiae* nachweisen, dass bei verschiedenen Dauerlarven- und Wirtsdichten jeweils ein konstanter Anteil der Dauerlarvenpopulation (etwa 20%) gegenüber *Galleria*-Larven infektiös ist. Die Regelmechanismen, die diesen Anteil der Dauerlarven infektiös machen, werden von den Autoren in der Dauerlarve selbst vermutet.

Campbell *et al.* (1999) konnten zeigen, dass der Anteil lebender Dauerlarven, die nach einer Köderungsrunde mit hoher Wirtsdichte (30 *Galleria*-Larven) noch im Bodensubstrat (Sand) nachweisbar waren, bei *H. bacteriophora* etwa bei 20% lag, während er bei allen *Steinernema*-Arten kleiner als 4% war. Diese Beobachtung untermauert die Vermutung, dass sich ein großer Teil der Dauerlarvenpopulation bei *H. bacteriophora* zu einem bestimmten Zeitpunkt nicht in einem infektiösen Zustand befindet.

O'Leary *et al.* (1998) konnten bei *H. megidis* nachweisen, dass Dauerlarven, die früher aus dem Insektenkadaver auswandern, eine bessere Wirtsfindung, eine geringere Wanderaktivität, eine höhere Temperaturtoleranz und eine geringere Austrocknungstoleranz aufweisen als die später auswandernden Dauerlarven. Die Autoren vermuten als Ursache für diese Unterschiede eine angepasste phänotypische Plastizität verschiedener Merkmalskomplexe bei den auswandernden Dauerlarven.

Griffin (1996) fand, dass die Infektiosität der Dauerlarvenpopulation bei *H. megidis* von deren vorheriger Lagerung beeinflusst wird, wobei die 'Zeit' und die 'Temperatur' die wichtigsten Parameter sind. Die Autorin beobachtete während der Lagerung eine Zunahme der Infektiosität der Dauerlarven bis zu einem Maximum und diskutiert hierfür zwei Erklärungsansätze (vgl. Abb. 4.1): (1) Die Dauerlarven werden aus einer Inhibition entlassen, (2) die Dauerlarven erfahren eine Art „Reifung“ (engl. *maturation*).

Fan & Hominick (1991) konnten bei verschiedenen *Steinernema*-Arten während der Lagerung bei niedrigen Temperaturen einen „U-förmigen“ Verlauf der Infektiosität feststellen.

Lewis *et al.* (1995) fanden bei einer Lagerungstemperatur von 25°C eine Abnahme der Infektiosität mit zunehmender Lagerungszeit bei *H. bacteriophora*, *S. glaseri* und *S. carpocapsae*. Die Abnahme war besonders ausgeprägt bei *H. bacteriophora*: von 40% in der 1. Woche auf 5% in der 6. Woche. Bei dieser Art konnte parallel eine starke Abnahme des Bakteriengehalts pro Dauerlarve festgestellt werden. Die Autoren geben als Erklärung für diese Beobachtung an, dass die Dauerlarven von *H. bacteriophora*, im Gegensatz zu *Steinernema*-Arten, ihre symbiotischen Bakterien auch verdauen und damit als Nahrungsressource nutzen können. Die eingelagerten symbiotischen Bakterien sind bei *H.*

bacteriophora wegen des geringen Umfangs des Fettdepots daher eine wichtige zusätzliche Energiereserve (vgl. Abschnitt 4.5.12).

All diese Beobachtungen zeigen, dass in einer Dauerlarvenpopulation die Infektiosität keine konstante Größe, sondern eine Funktion von äußeren (exogenen) und inneren (endogenen) Faktoren ist (Abb. 4.1).

Da die Infektion eines Insekts für die Dauerlarven mit dem Übergang zur Weiterentwicklung durch das *recovery* gekoppelt ist (vgl. Abschnitt 1.2.1), soll an dieser Stelle eine kurze Darstellung der mit dem Übergang zum Dauerlarven-Stadium korrelierten Faktoren bei *C. elegans* erfolgen (vgl. Abb. 4.1). Die Dauerlarve entspricht sowohl bei EPN als auch bei *C. elegans* dem dritten Larvenstadium; auch funktionell entsprechen sich die Stadien (Fodor *et al.*, 1990). Es ist daher davon auszugehen, dass prinzipiell ähnliche Regelmechanismen an der Ausbildung bzw. der Weiterentwicklung der Dauerlarve beteiligt sind (Riddle & Albert, 1997).

Die Ausbildung des Dauerlarven-Stadiums bei *C. elegans* wird durch die gleichen (exo- und endogenen) Faktoren beeinflusst wie der Übergang zur Weiterentwicklung. Die wichtigsten Faktoren sind dabei die Temperatur, das Futterangebot und die dichteabhängige Wirkung eines Pheromons (Riddle & Albert, 1997). Eine hohe Pheromon-Konzentration, geringes Futterangebot und höhere Temperaturen fördern die Bildung des Dauerlarven-Stadiums, während eine niedrige Pheromon-Konzentration, ein hohes Futterangebot und niedrigere Temperaturen die Entwicklung zur Dauerlarve unterdrücken. In diesem komplexen Regelwerk sind mehr als 30 Gene involviert (sog. *daf*-Gene = *dauer formation*). In Abb. 4.1 sind einige dieser Gene und deren (mögliche) Funktion sowie drei potentiell involvierte Signaltransduktionen dargestellt. Für bestimmte chemosensorische Neurone wird z.B. ein Mitglied der TGF- β -Familie (*transforming growth factor*) als Neuromodulator angenommen, das die Synthese oder Sekretion eines Hormons reguliert.

Die Kenntnisse über molekulare Regelmechanismen zur Bildung des Dauerlarven-Stadiums bei *C. elegans* könnten wertvolle Forschungsansätze für die Untersuchung der Mechanismen liefern, welche einen Teil der Dauerlarvenpopulation von EPN in einen „infektiösen Zustand“ versetzt.

Von einigen Insektiziden und Nematiziden, wie z.B. dem Oxamyl, sowie von einigen Pflanzensäften, wie z.B. aus Aloe oder Kohl, ist bekannt, dass sie die Aktivität der Dauerlarven von EPN stimulieren können (Ishibashi & Kondo, 1990). Auch die Untersuchung der Mechanismen dieser Aktivierung könnte dazu beitragen, die phasenweise Infektiosität einzelner Dauerlarven zu verstehen.

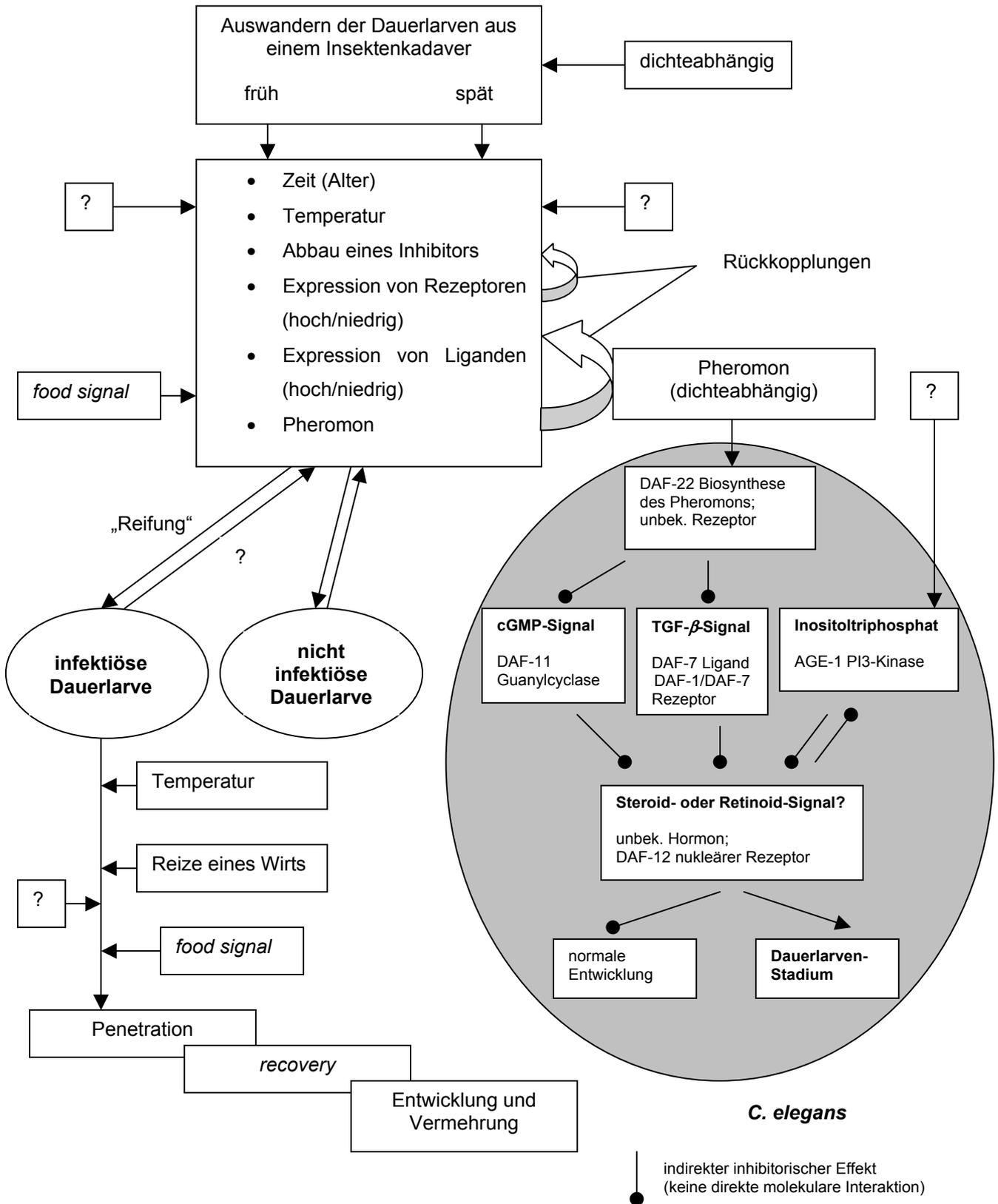


Abb. 4.1. Schema der (möglichen) Einflussfaktoren für die Ausbildung eines infektiösen Zustands im Dauerlarven-Stadium bei entomopathogenen Nematoden. Der rechte, grau unterlegte Bereich stellt den bei *C. elegans* postulierten Mechanismus und die beteiligten Signaltransduktionswege für die Entstehung des Dauerlarven-Stadiums dar (nach Riddle & Albert, 1997). Der „Austritt“ aus dem Dauerlarven-Stadium wird durch die gleichen Faktoren bestimmt wie der „Eintritt“ (Temperatur, Futterangebot, Pheromon). DAF = Genprodukte der *daf*-Gene (engl. *dauer formation*) von *C. elegans*; AGE-1 = Genprodukt des Gens *daf-23* (= *age-1*); cGMP = cyclisches Guanosylmonophosphat; TGF- β = transforming growth factor beta.

4.4.4 Die Penetrationsroute bei *M. melolontha*-Larven (*in vivo*)

Die Penetrationsroute *in vivo* bei *M. melolontha*-Larven wurde durch Sektion der Larven und anschließende Bestimmung der Zahl und des Aufenthaltsorts der Nematoden ermittelt. Eine eindeutige Präferenz einer Route lässt sich aus den Ergebnissen nicht ableiten (Abb. 3.10-3.12). Beide Nematodenarten penetrieren sowohl über den Mitteldarm als auch über den Enddarm. Im Mitteldarm wurden meist weniger Nematoden gefunden als im Enddarm. Für *H. bacteriophora* dürfte die Penetration über das Darmsystem, wenn sie nicht schnell vonstatten geht, mit hohen Ausfällen verbunden sein, da die *in vitro* Inkubation in Darmsaft die meisten Dauerlarven abtötete (vgl. Abschnitt 4.4.7). Bei den Verhältnissen *in vivo* dürfte die Sterberate noch größer sein, da weitere überlebensfeindliche Faktoren hinzukommen, wie z.B. die reduzierenden Bedingungen des Darmmilieus und die effizientere Wirkung von Proteasen (Wagner & Schnetter, 2001). Sulistyanto (1997) fand dagegen die meisten Dauerlarven von *H. bacteriophora* bei *P. horticola*-Larven im Mitteldarm; dies ist ein Hinweis dafür, dass die Nematoden bei diesen Larven bevorzugt über den Mund penetrieren.

Die Ergebnisse zur Penetrationsroute variierten in Abhängigkeit vom Testsystem und vom Larvenstadium. Im Ergebnisteil wurde bereits auf die höhere Penetrationsrate bei den L2-Larven, die sich kurz vor oder in der Häutungsphase befanden, verwiesen. Ähnliche Beobachtungen wurden von Tomalak (1999; pers. Mitteilung) bei Larven von *A. solstitialis* gemacht. Die höhere Empfindlichkeit der Larven während der Häutung ist wahrscheinlich auf die eingeschränkte Beweglichkeit und die noch weichen kutikulären Strukturen der Larven zurückzuführen.

Die Penetrationsroute zwischen verschiedenen Nematoden- und Insektenarten variiert. Bei *Galleria*-Larven konnte nachgewiesen werden, dass die Dauerlarven von *H. heliothidis* und *S. kraussei* sowohl über das Darmsystem (über Mund und Anus) als auch über das Tracheensystem penetrieren (Mráček *et al.*, 1988). Eine direkte Penetration der Kutikula scheint zwar möglich (Bedding & Molyneux, 1982; vgl. Abschnitt 4.4.6) aber nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (Mráček *et al.*, 1988). Peters (1994) dagegen wies bei der Art *S. feltiae* nach, dass die direkte Penetration der Kutikula bei Schnakenlarven (*Tipula* spp.) die bedeutendste Penetrationsroute darstellt.

Die in Anlehnung an Mráček *et al.* (1988) durchgeführte Versiegelung von Körperöffnungen bei *M. melolontha*-Larven zeigte, dass lediglich bei *S. glaseri* die Anzahl penetrierter Nematoden im Vergleich zu unversiegelten Tieren deutlich kleiner war. Bei der Mortalität konnte zwischen beiden Nematodenarten kein Unterschied festgestellt werden. Die Mortalität war bei den Tieren mit gleichzeitig versiegeltem Mund und Anus am höchsten (Abb. 3.19).

Dieser Befund könnte darauf beruhen, dass der durch die Versiegelung verursachte Stress für die *M. melolontha*-Larven das Eindringen der Nematoden erleichterte. Ein wesentlicher Faktor dabei dürfte die eingeschränkte Beweglichkeit und Wahrnehmungsfähigkeit der Larven spielen.

Ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die Penetrationsrate erhielt Sulistyanto (1997) nach Versiegelung von Körperöffnungen bei *P. horticola*-Larven.

4.4.5 *H. bacteriophora* penetriert bevorzugt über den Mund, während *S. glaseri* die Route über den Anus bevorzugt

Bei den vergleichenden Untersuchungen zur Penetrationsroute der Nematoden in die *M. melolontha*-Larven ließen lediglich die Versuche verwertbare Rückschlüsse zu, bei denen die Larven entweder mit dem Mund (Kopf) oder dem Anus (Hinterende) den Nematoden zugänglich waren. Die Ergebnisse zeigen, dass *H. bacteriophora* effektiver über den Mund und *S. glaseri* effektiver über den Anus penetriert. Die nach der Exposition des Mundes oder des Anus jeweils erreichte Wirksamkeit (Mortalität) unterschied sich bei den höheren Dosierungen bei *H. bacteriophora* signifikant (Abb. 3.17). Dagegen war die Anzahl der jeweils penetrierten Dauerlarven sehr klein und kaum verschieden (Abb. 3.15). Umgekehrt unterschied sich die Zahl der penetrierten Dauerlarven bei *S. glaseri* sehr stark voneinander (Abb. 3.16), während die Wirksamkeit nahezu identisch war (Abb. 3.18). Aus diesen Differenzen lässt sich mehrerlei ableiten: (1) Es genügen nur sehr wenig penetrierte Dauerlarven von *H. bacteriophora* um eine *M. melolontha*-Larve abzutöten, (2) bei *S. glaseri* ist der Infektionserfolg unabhängig von der Penetrationsroute, (3) bei *H. bacteriophora* ist die Penetration über den Mund mit besseren Chancen für eine erfolgreiche Infektion verbunden, (4) demzufolge hat die Art und Weise der Penetration für *H. bacteriophora* einen Einfluss auf den Infektionserfolg.

Forschler & Gardner (1991) fanden sowohl für *H. heliothidis* als auch für *S. carpocapsae* bei vergleichbaren Versuchen an Larven von *Phyllophaga hirticula* eine höhere Wirksamkeit nach Exposition des Kopfes. Die Mortalität bei Exposition von Mund versus Anus war bei *H.h.* 63% zu 14% und bei *S.c.* 75% zu 18%. Die Zahl der penetrierten Nematoden wurde von den Autoren jedoch nicht ermittelt.

4.4.6 Die Möglichkeit einer direkten Penetration der Kutikula in intersegmentalen Bereichen ist für *H. bacteriophora* nicht auszuschließen

Sulistyanto (1997) konnte unter Verwendung von Penetrationskammern, bei denen ein Stück der Epidermis einer Insektenlarve zwischen die verbindenden Öffnungen zweier Kammern gespannt wird, eine direkte Penetration der Dauerlarven durch die Kutikula bzw. Epidermis¹ von *M. melolontha*-Larven *in vitro* nachweisen. Der Anteil penetrierter Dauerlarven der Arten *H. bacteriophora* und *S. glaseri* nach 20 Stunden lag bei der Epidermis von *M. melolontha*-Larven in der gleichen Größenordnung (1-3%), während bei der Epidermis von *Galleria*-Larven deutlich mehr Dauerlarven von *H. bacteriophora* (8-30%) als von *S. glaseri* (1-3%) penetrierten (allerdings bei unterschiedlichen Reizquellen). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Epidermis von *M. melolontha*-Larven schwerer penetrierbar ist als die von *Galleria*-Larven. Die hohe Penetrationsrate bei *H. bacteriophora* weist darauf hin, dass die direkte Penetration der Kutikula auch *in vivo* eine Rolle spielt.

Vergleichbare Untersuchungen wurden auch in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, hatten jedoch zum Ergebnis, dass beide Nematodenarten die Epidermis von *M. melolontha*-Larven nicht penetrierten (Daten nicht dargestellt). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die eingespannten Epidermisbereiche dem Abdomen der *M. melolontha*-Larven entstammten und daher sehr dick waren. Vergleichende Versuche mit Epidermisbereichen, die Intersegmentalhäutchen einschließen, z.B. um die Beine, wurden nicht durchgeführt. In diesen Bereichen wäre eine direkte Penetration eher zu erwarten (vgl. weiter unten).

Bei *H. bacteriophora* deuten indes Beobachtungen aus anderen Versuchen dieser Arbeit auf die Möglichkeit einer direkten Penetration der Epidermis, insbesondere im vorderen Körperbereich und um den Kopf der *Melolontha*-Larven, hin. Diese Beobachtungen sind: (1) die höhere Penetrationsrate und Wirksamkeit nach Exposition des Kopfes (Abschnitt 3.4.2, Abb. 3.15 und 3.17), (2) der geringe Unterschied in der Penetrationsrate nach Versiegelung des Mundes und des Anus (Abb. 3.20), (3) der vergleichsweise hohe Anteil der nach kurzer Zeit im Hämocoel nachweisbaren Dauerlarven (Abb. 3.10-3.12) und (4) der frühe Nachweis der symbiotischen Bakterien in der Hämolymphe (Abb. 3.7-3.9 und 3.23).

Eine direkte Penetration *in vivo* konnte jedoch nicht beobachtet werden. Auch eine indirekte Beobachtung über den nach der Penetration einer Dauerlarve um die Eintrittsstelle entstehenden Melaninpropfen bzw. -ring, wie er z.B. bei *P. japonica*-Larven für *H. bacteriophora* nachgewiesen wurde (Wang & Gaugler, 1998), war nicht möglich.

¹ Die Begriffe Kutikula und Epidermis werden im folgenden Text einzeln verwendet, meinen aber immer beides zusammen

Bei vergleichbaren *in vivo* Untersuchungen an *P. japonica*-Larven fanden Wang & Gaugler (1998), dass etwa 75% der Dauerlarven von *H. bacteriophora* über die Kutikula und etwa 25% über den Mitteldarm in das Hämocoel penetrieren. Etwa 64% der Eintrittsstellen durch die Kutikula befanden sich in den Intersegmentalbereichen der Beine und 36% in den Intersegmentalbereichen der Maxillen.

Eine direkte Penetration der Epidermis durch *H. bacteriophora* konnte von Bedding & Molyneux (1982) bei verschiedenen Insektenlarven (z.B. *Galleria*, *O. sulcatus*) nachgewiesen werden. Die Autoren betonen die Bedeutung eines „Zahnes“ am Kopf der Dauerlarve, der dazu dient, die Kutikula des Insekts zu durchbrechen. Dieser Zahn wird erst freigelegt, wenn die Dauerlarven die schützende Kutikula des L2-Stadiums abstreifen, was in der Regel vor bzw. während der Penetration geschieht. Eine vergleichbare Struktur ist bei *Steinernema*-Arten nicht bekannt.

Bei einem direkten Vergleich der zitierten Ergebnisse bei *P. japonica*-Larven mit den Ergebnissen bei *M. melolontha*-Larven in der vorliegenden Arbeit ist unbedingt der unterschiedliche Habitus der Larven zu berücksichtigen. Die Larven von *P. japonica* sind viel fragiler und entsprechen ihrem Habitus in etwa den Larven des heimischen Gartenlaubkäfers (*Phyllopertha horticola*). Die Larven dieser beiden Arten sind gegenüber EPN weitaus anfälliger als *M. melolontha*-Larven (vgl. z.B. Wang *et al.*, 1995; Sulistyanto, 1997). Die L3-Larven beider Arten wiederum sind am ehesten mit L2-Larven von *M. melolontha* vergleichbar.

4.4.7 Dauerlarven von *H. bacteriophora* sind relativ anfällig gegenüber Darmsaft und Hämolymphe von *M. melolontha*-Larven, *S. glaseri* ist weitgehend resistent

Die Dauerlarven von *H. bacteriophora* waren relativ anfällig gegenüber Darmsaft des Mittel- und Enddarms von *M. melolontha*-Larven. Etwa 60% bzw. 46% der Dauerlarven waren nach 24 Stunden Inkubation tot, während es bei *S. glaseri* nach dieser Zeit weniger als 5% waren (Abschnitt 3.4.3, Abb. 3.21 und 3.22). Dagegen unterschied sich der Anteil toter Dauerlarven nach der Inkubation in Hämolymphe weniger deutlich. Nach 24 Stunden waren 13% der Dauerlarven von *H. bacteriophora* tot, während es bei *S. glaseri* etwa 3% waren (Abb. 3.23). Diese Ergebnisse lassen auf eine höhere Anfälligkeit der Dauerlarven von *H. bacteriophora* gegenüber den Abwehrsystemen der *M. melolontha*-Larven schließen. Sie zeigen darüber hinaus, dass ein hoher Anteil der (primär) penetrierten Dauerlarven bei *H. bacteriophora* nicht überlebt.

Ähnliche Ergebnisse berichten Wang *et al.* (1995) von Untersuchungen an *P. japonica*-Larven. Nach 16 Stunden Inkubation waren etwa 85% der Dauerlarven von *H. bacteriophora* (HP88), aber lediglich 20% von *S. glaseri* (NC) tot. Der Anteil überlebender Dauerlarven 64 Stunden nach deren hämocoaler Injektion war bei *H. bacteriophora* stets < 25% (nach Injektion von 1 und 2 DL < 10%), während er bei *S. glaseri* in fast allen Dosierungen > 75% war (nach Injektion von 1 DL etwa 50%).

In der vorliegenden Arbeit wurde der jeweilige Anteil toter Dauerlarven in den Insekten nicht separat ausgewertet. Der geringe Anteil infizierter *M. melolontha*-Larven mit erfolgreicher Nematodenvermehrung nach oraler Injektion der Nematoden bei *H. bacteriophora* (Abschnitt 3.3.2, Tab. 3.3) ist jedoch ein Hinweis dafür, dass ein Großteil der penetrierten Dauerlarven *in vivo* nicht überlebt. Im Gegensatz hierzu war nach hämocoaler Injektion der Nematoden der Anteil infizierter *M. melolontha*-Larven mit erfolgreicher Nematodenvermehrung bei *H. bacteriophora* wesentlich höher als bei *S. glaseri*. Dies lässt sich wahrscheinlich auf die schnelle Freigabe der symbiotischen Bakterien und deren unmittelbare Wirkung bzw. schnelle Vermehrung in der Hämolymphe zurückführen.

Bei *P. japonica*-Larven ist die Wirksamkeit nach externer Applikation der Nematoden für beide Nematodenarten etwa gleich groß (Yeh & Alm, 1992; Wang *et al.*, 1995), obwohl *S. glaseri* in höherem Ausmaß penetriert. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen gezeigt, dass *S. glaseri* bei *M. melolontha*-Larven sowohl besser wirkt als auch in höherem Ausmaß penetriert als *H. bacteriophora*.

Die Differenzen in der Wirksamkeit der beiden Nematodenarten beruhen demzufolge auf der geringeren Penetrationsfähigkeit von *H. bacteriophora* in *M. melolontha*-L3-Larven. Der geringere Unterschied der Penetrationsrate und der Wirksamkeit zwischen beiden Nematodenarten bei den L2-Larven, die dem Habitus einer *P. japonica*-Larve eher entsprechen, unterstützt diese Hypothese zusätzlich.

Wang *et al.* (1995) stellten fest, dass penetrierte Dauerlarven von *H. bacteriophora* eine stärkere Immunreaktion, d.h. eine Einkapselung und Melanisierung, auslösen als Dauerlarven von *S. glaseri*. Als Folge davon wurden etwa 90% der penetrierten Dauerlarven von *H. bacteriophora* eingekapselt, während es bei *S. glaseri* nur 24% waren.

4.4.8 Bei L2-Larven von *M. melolontha* war die Phenoloxidase-Aktivität geringer

Die Aktivierung der Prophenoloxidase-Kaskade führt zur Melanisierung eingedrungener Pathogene und Parasiten und spielt eine wichtige Rolle im Immunsystem von Insekten und anderer Invertebraten (Götz, 1988; Dunphy & Thurston, 1990). Der Nachweis der

Prophenoloxidase-Aktivität in der vorliegenden Arbeit erfolgte über die Umsetzung von Dopamin zu Dopaminchinon (Jiang *et al.*, 1998; vgl. Abschnitt 2.4.6).

Die Phenoloxidase-Aktivität der Hämolymphe war sowohl bei *Galleria*- als auch bei *Tenebrio*-Larven signifikant höher als bei den Scarabaeiden-Larven (Abb. 3.24). Dies überrascht zunächst, da sich die Phenoloxidase-Aktivität damit genau umgekehrt zu der Anfälligkeit der Larven gegenüber EPN verhält. Dieser Befund beweist daher, dass die Phenoloxidase kein entscheidender Faktor für die Anfälligkeit einer Insektenart gegenüber EPN ist. Ein entscheidender Faktor scheint dagegen die Penetrationsfähigkeit der Nematoden zu sein, wie die Versuche zur Infektionsdynamik ergaben (vgl. Abschnitt 4.4.2). Die Tatsache, dass bereits 1-2 injizierte Bakterienzellen eine *Galleria*-Larve töten (Milstead; 1979; vgl. Abschnitt 4.3.4) lässt darauf schließen, dass die symbiotischen Bakterien weitgehend resistent gegenüber dem Immunsystem von Insekten sind (vgl. Dunphy & Thurston, 1990).

Zwischen *M. melolontha*-L2- und L3-Larven konnte ein signifikanter Unterschied in der Phenoloxidase-Aktivität festgestellt werden (Abb. 3.24). Die LD₅₀ bei hämocoaler Injektion der symbiotischen Bakterien war bei L2-Larven etwa um den Faktor 13 geringer (Abb. 3.24, Tab. 3.5). Demnach könnte die geringere Phenoloxidase-Aktivität in der Hämolymphe von L2-Larven für die geringere LD₅₀ mitverantwortlich sein. Da jedoch die Anzahl penetrierter Nematoden nach externer Applikation in den L2-Larven wesentlich höher war als in den L3-Larven (Abb. 3.8-3.9, Tab. 3.6), lässt sich auch hier folgern, dass die Phenoloxidase-Aktivität für die Abwehr der Nematoden eine untergeordnete Rolle spielt.

Die Phenoloxidase-Aktivität bei *P. japonica*-L3-Larven war wesentlich niedriger als bei *M. melolontha*-L3-Larven, aber geringfügig höher als bei L2-Larven. Angesichts dessen überrascht die ausgeprägte und offenbar leicht zu beobachtende Immunreaktion (Melaninringe) bei *P. japonica*, wie sie Wang & Gaugler (1998) beschreiben. Für die Aktivierung der Immunreaktion ist die Erkennung von Fremdmaterial entscheidend (Götz, 1988; Dunphy & Thurston, 1990). Möglicherweise gibt es in diesem Punkt Unterschiede zwischen den Larven dieser beiden Käferarten (vgl. Trenczek, 2001).

Bei *Melolontha*-Larven konnten relativ hohe Mengen (250-500 µg/ml) Lysozym in der Hämolymphe nachgewiesen werden (Trenczek, 2000; pers. Mitteilung). Bei anderen Käferarten wurden antibakterielle Proteine wie Defensine und Coleoptericin nachgewiesen (Trenczek, 2000; pers. Mitteilung). Möglicherweise besitzen *Melolontha*-Larven eine gute Ausstattung mit antibakteriellen Proteinen, während die Aktivierung der Prophenoloxidase-

Kaskade etwas träger reagiert. Die Klärung dieser Sachverhalte bedürfte jedoch eingehender Untersuchungen.

Bei *Galleria*-Larven wurde nachgewiesen, dass die Phenoloxidase-Aktivität sowohl durch *H. megidis* als auch durch *S. feltiae* in etwa gleichem Ausmaß erhöht wird (Ehlers & Beetz, 1998). Die Autoren benutzten eine spektrophotometrische Messung mit Dopa als Substrat.

Von anderen Insektenarten ist bekannt, dass die Abwehr von penetrierten Nematoden mit unterschiedlichen Strategien erfolgen kann. So gilt bei den meisten Dipteren die Melanisierung als die wichtigste Immunreaktion gegen Filarien, während bei Kriebelmücken (Simuliidae), die durch *Onchocerca* sp. befallen werden, keine Melanisierung stattfindet und daher anderen Immunsystemkomponenten, z.B. antibakterielle Proteine/Peptide oder Lektine, eine größere Bedeutung zukommt (Trenczek, 2001).

4.4.9 Das Vermehrungspotential² in verschiedenen Insektenlarven

Voraussetzung für eine Selektion auf höhere Infektiosität gegenüber einem bestimmten Wirt ist die Vermehrungsfähigkeit der Nematoden in diesem Wirt (vgl. Kapitel 4.5). Das Vermehrungspotential erlaubt aber auch Rückschlüsse auf die Ressourcennutzung in dem befallenen Wirt.

Bei *H. bacteriophora* war das Vermehrungspotential in allen untersuchten Insektenlarven größer als bei *S. glaseri*. Die größere Art produzierte also jeweils weniger Nachkommen. Der größte Unterschied (etwa Faktor 8) war bei *Galleria*-Larven zu beobachten (Abb. 3.25). Bei den anderen Insektenlarven (*M.m.*, *M.h.*, *A.s.*, *T.m.*) war der Faktor geringer (im Bereich von 2-6).

Das hohe Vermehrungspotential in *Galleria*- im Vergleich zu *M. melolontha*-Larven könnte darauf beruhen, dass in letzteren der hohe Gewichtsanteil des Enddarms (= „Gärsack“) dazu beiträgt, den Anteil verwertbarer Gewebe zu reduzieren. Bei *S. glaseri* war zudem eine Tendenz zu längeren Dauerlarven bei der Vermehrung in *M. melolontha*-Larven zu erkennen, d.h. es entstanden weniger, dafür aber größere Dauerlarven (vgl. Abschnitt 4.5.9-4.5.11).

Für eine grobe Bilanzierung der Ressourcennutzung in den verschiedenen Insektenlarven wurde das durchschnittliche Vermehrungspotential (VP in DL/g) durch den LD_{50} -Wert (DL) dividiert. Der so erhaltene Wert gibt einen Anhaltspunkt über den Vermehrungsfaktor (VF in 1/g) bezogen auf die Dauerlarvenpopulation. Zur Berechnung der Vermehrungsbilanz (VB in

² Der Begriff „Vermehrungspotential“ wird in vorliegender Arbeit im Sinne von Reproduktionsrate bzw. Vermehrungsrate der Nematoden in einer Insektenlarve verwendet. Es wurde anhand der ausgewanderten Dauerlarven ermittelt und auf das Lebendgewicht der Insektenlarven bezogen (Angabe in DL/g).

1/g·d) wurde dieser Wert anschließend durch die Summe aus der LT_{50} -Zeit und der mittleren Zeit bis zum Auswandern der Dauerlarven (VZ = Vermehrungszeit; Angabe in Tagen = d) dividiert:

$$VF = \frac{VP}{LD_{50}} \quad VB = \frac{VF}{LT_{50} + VZ} \quad (4.1)$$

Tab. 4.1. Beispiel einer Bilanzierung der Ressourcennutzung in *Tenebrio*- und *M. melolontha*-Larven. Die zur Berechnung nötigen Werte finden sich in Tab. 3.2. Für die Zeit bis zur Auswanderung der Dauerlarven wurde für *H. bacteriophora* 13-14 Tage und für *S. glaseri* 9-10 Tage angenommen. VF = Vermehrungsfaktor; VB = Vermehrungsbilanz.

Nematode	<i>Tenebrio</i> -Larven		<i>M. melolontha</i> -Larven (L3)	
	VF [1/g]	VB [1/g·d]	VF [1/g]	VB [1/g·d]
<i>H.b.</i> HYB	32778	1852	17	0,54
<i>S.g.</i> NC	20690	1696	33	1,69

Die Tab. 4.1 verdeutlicht, dass es für die Vermehrungsbilanz bei *Tenebrio*-Larven zwischen *H. bacteriophora* und *S. glaseri* kaum einen Unterschied gibt, während sie bei *M. melolontha*-Larven bei *S. glaseri* etwa um den Faktor 3 größer ist. Die wesentlich kleineren Vermehrungsfaktoren und Vermehrungsbilanzen bei den *M. melolontha*-Larven verdeutlichen, dass diese Larven weitaus geringer „verwertet“ werden können als z.B. die *Tenebrio*-Larven. Die größeren Unterschiede zwischen beiden Nematodenarten bei den *M. melolontha*-Larven beruhen in erster Linie auf den großen Differenzen zwischen den LD_{50} - und LT_{50} -Werten. Das Vermehrungspotential für sich alleine hat keinen großen Aussagewert. Erst durch die Berücksichtigung der LD_{50} -Werte, bzw. allgemeiner formuliert, der Anzahl applizierter (penetrierter) Nematoden, sind Vergleiche sinnvoll, da dadurch die Werte relativiert werden. Bei den hoch anfälligen *Galleria*- und *Tenebrio*-Larven unterscheiden sich die LD_{50} -Werte zwischen beiden Nematodenarten kaum, so dass die Bilanzierung nur geringe Unterschiede ergibt.

Aufgrund der großen Differenz zwischen der Zahl applizierter und der Zahl penetrierter Nematoden bei *H. bacteriophora* ist davon auszugehen, dass der Vermehrungsfaktor bezogen auf die Zahl penetrierter Dauerlarven weitaus größer ist als der in Tab. 4.1 angegebene Wert, der sich auf die Zahl applizierter Nematoden bezieht. Tatsächlich ergibt sich für *H. bacteriophora* für VF dann ein Wert von 1176 1/g ($VB = 38$ 1/g·d) und für *S. glaseri* von 93 1/g ($VB = 5$ 1/g·d). Bei dieser Bilanzierung ist also der VB -Wert für *H. bacteriophora* etwa um den Faktor 8 größer. Dies heißt mit anderen Worten, dass die Bilanz auf eine einzelne

penetrierte Dauerlarve bezogen für *H. bacteriophora* und auf die gesamte Dauerlarvenpopulation bezogen bei *S. glaseri* besser ist (vgl. Kapitel 4.5).

Boff (2001) stellte fest, dass die Reproduktionsrate (= Vermehrungsfaktor) von *H. megidis* in *Galleria*-Larven bezogen auf die penetrierten Dauerlarven (DL) mit zunehmender Penetrationsrate und zunehmender Dosis von $VF = 7027$ bei 10 applizierten und 4 penetrierten DL auf $VF = 13$ bei 3000 applizierten und 763 penetrierten DL abnahm. Diese Beobachtung dürfte die unmittelbare Folge von intraspezifischer Konkurrenz innerhalb des Kadavers sein (vgl. Abschnitt 4.4.11).

Eine in der Populationsdynamik von Parasiten häufig angewandte Größe ist die Vermehrungsrate R_p , die angibt, wie hoch die durchschnittliche Anzahl neuer Infektionen ist, nachdem eine erfolgreiche Vermehrung in einem Wirt stattfand (Begon *et al.*, 1991; S. 460ff). R_p bezieht sich also auf die Verbreitung der Parasiten innerhalb der Wirtspopulation und sollte daher nicht mit dem Vermehrungspotential verwechselt werden. Für Makroparasiten wie Nematoden ist R_p wie folgt definiert (Begon *et al.*, 1991; S. 460ff):

$$R_p = \underbrace{(\lambda L_a f_a)}_{\text{innerhalb}} \cdot \underbrace{(\beta N L_i f_i)}_{\text{außerhalb des Wirts}} \quad (4.2)$$

Übertragen auf EPN bedeuten die einzelnen Parameter:

λ = Vermehrungsfaktor pro penetrierter Dauerlarve, β = Penetrationsrate pro Zeiteinheit (= Übertragungsrate), N = Wirtsdichte, L_a = Vermehrungszeit im Wirt, L_i = Überlebensdauer der Dauerlarven außerhalb des Wirts, f_a = Überlebensrate penetrierter Dauerlarven und f_i = Anteil infektiöser Dauerlarven (= α). Der erste Term (innerhalb) entspricht also dem Vermehrungspotential (VP) der Nematoden multipliziert mit der Vermehrungszeit (VZ), der zweite berücksichtigt die Parameter der Infektionsdynamik.

Von diesen Parametern wurden λ , β , L_a , f_a , f_i direkt oder indirekt ermittelt. Die Überlebensrate im Wirt wurde indirekt aus der Mortalität der Dauerlarven nach der Inkubation in Darmsaft abgeschätzt (= $(1 - (\text{Mortalität in \%}/100))$); vgl. Abschnitt 4.4.7). Demnach ergeben sich für die beiden Nematodenarten bei Larven von *M. melolontha* (L3) folgende Berechnungen ($N = 1$):

$$\begin{aligned} H.b.: \quad R_p &= 1176 \text{ g}^{-1} \cdot 14 \text{ d} \cdot 0,2 \cdot 0,192 \text{ DL/d} \cdot 0,0084 \cdot L_i = & \underline{5,3 \text{ DL/g} \cdot L_i} \\ S.g.: \quad R_p &= 93 \text{ g}^{-1} \cdot 10 \text{ d} \cdot 0,8 \cdot 0,456 \text{ DL/d} \cdot 0,1398 \cdot L_i = & \underline{47,4 \text{ DL/g} \cdot L_i} \end{aligned}$$

Auch mit dieser Berechnung ergibt sich für *S. glaseri* bezogen auf die Dauerlarvenpopulation eine günstigere Gesamtbilanz, zumal die durchschnittliche Überlebensdauer außerhalb des Wirts (= L_i) für *S. glaseri* wesentlich länger ist (vgl. Lewis *et al.*, 1995).

4.4.10 Modelle zur Beschreibung der Befallsstrategie

Zur Beschreibung der Befallsstrategie wurde die Verteilung der Nematoden in befallenen Insektenlarven untersucht, um dadurch Rückschlüsse auf den Grad der Aggregation und die „Zufälligkeit“ des Befalls ziehen zu können.

Die Verteilung der Nematoden ist von deren Verhalten gegenüber dem jeweiligen Insekt abhängig. Das Verhalten wird zudem von äußeren Faktoren beeinflusst, wie z.B. den Bedingungen des Testsystems. Im Testsystem I spielt das aktive Suchen des Wirts durch die Dauerlarven aufgrund des größeren Volumens des Bodensubstrats eine wichtigere Rolle als im Testsystem II. Entsprechend konnte im Testsystem II (24-Loch-Platten) mit *Tenebrio*-Larven für beide Nematodenarten und bei allen Nematoden-Dichten die beste Beschreibung der Daten durch die Negative Binomial-Verteilung erreicht werden (Abschnitt 3.4.5, Tab. 8.3 und 8.4, Abb. 3.27). Im Testsystem I konnten dagegen größere Unterschiede zwischen den Nematodenarten und den verschiedenen Dichten beobachtet werden (Abb. 3.26).

Bei niedrigen Nematoden-Dichten lässt sich der Befall einer *Tenebrio*-Larve durch *H. bacteriophora* im Testsystem I am besten als ein zufälliges Ereignis beschreiben (Poisson-Verteilung; Tab. 8.1, Abb. 3.26). Dagegen ergab bei *S. glaseri* die Binomial-Verteilung die beste Beschreibung (Tab. 8.2, Abb. 3.26). Bei mittleren Nematoden-Dichten war bei *H. bacteriophora* die Binomial- und bei *S. glaseri* die Negative Binomial-Verteilung die passendste Verteilungsfunktion, bei höheren Dichten war es für beide Nematodenarten die Negative-Binomial-Verteilung. Diese Ergebnisse sind ein Hinweis dafür, dass *S. glaseri* aktiver sucht (wandert) und effizienter einen Wirt findet und penetriert als *H. bacteriophora*. Dieser Befund wird auch durch die Ergebnisse der Versuche zur Wirtsfindung in Sandröhren bestätigt (vgl. Abschnitt 3.4.1).

Westerman (1997) konnte zeigen, dass der Befall von *Galleria*-Larven durch *H. megidis* am besten durch die Poisson-Verteilung beschrieben wird, also einem zufälligen Ereignis gleichkommt. Für den Befall von *O. sulcatus*-Larven war dagegen die Negative Binomial-Verteilung das passendere Modell; die Aggregation der Dauerlarven war in diesen Larven erheblich höher als in den *Galleria*-Larven.

Für die Verteilung der Nematoden in *M. melolontha*-Larven konnte aufgrund zu kleiner Datensätze kein statistischer Vergleich vorgenommen werden. Die Daten lassen jedoch eine Aggregation der Dauerlarven erkennen (vgl. Tab. 3.8). Die Aggregation war in allen Fällen bei *S. glaseri* ausgeprägter als bei *H. bacteriophora* (Tab. 3.8 und 8.5). Dieser Befund beruht wahrscheinlich auf der höheren Wanderaktivität und dem höheren Anteil infektiöser Dauerlarven (= α) bei *S. glaseri*.

Die Aggregation der Nematoden in befallenen Insektenlarven lässt darauf schließen, dass bereits befallene Larven für die Dauerlarven attraktiver sind als nicht befallene. Dies könnte folgende Ursachen haben: (1) Befallene Insektenlarven sind bereits deutlich geschwächt und daher für weitere Dauerlarven leichter zu befallen, (2) befallene Insektenlarven und/oder penetrierte Dauerlarven geben Signalstoffe ab, die verstärkt weitere Dauerlarven anziehen („Rekrutierung“).

Anderson (1978a) erwähnt, dass die ungleiche Verteilung von Parasiten (= Aggregation) häufig auf geringen Unterschieden in der Anfälligkeit einzelner Wirte beruht. Da die Anfälligkeit von der Penetrationsmöglichkeit der Dauerlarven abhängt, kommen in erster Linie Faktoren in Betracht, welche die Penetration beeinflussen. Solche Faktoren sind z.B. die bereits erwähnte Häutung der Insektenlarven, während der die Kutikula dünn und weich ist. Weitere Faktoren sind kleine Verletzungen, die Vorbelastung mit einem weiteren Pathogen sowie die Fress- und Defäkationsrate (vgl. Forschler & Gardner, 1991). Auch Verhaltensabweichungen der Larven, wie sie durch eine Rickettsien-Infektion (Kapitel 4.3) oder das Versiegeln des Mundes und des Anus verursacht werden (Abschnitt 4.4.4 – 4.4.6), spielen eine Rolle.

Einige Indizien weisen auf die Abgabe von Signalstoffen hin. So ist z.B. aus Auswahlversuchen bekannt, dass Dauerlarven von *H. bacteriophora* bevorzugt Kolonien der primären Form ihrer symbiotischen Bakterien aufsuchen (Krasomil-Osterfeld, 1993; vgl. Abschnitt 4.5.13). Demnach geben die Bakterien Signalstoffe ab, die weitere Dauerlarven anlocken und zur Penetration veranlassen. Sulistyanto (1997) konnte anhand von *in vitro* Untersuchungen an Penetrationskammern zeigen, dass Dauerlarven von *S. feltiae* bereits bestehende Penetrationslöcher in der Insektenkutikula weitaus häufiger mehrfach nutzen als *H. bacteriophora*. Dies könnte darauf beruhen, dass Dauerlarven von *Steinernema*-Arten während der Penetration eine „Spur“ legen, durch die weitere Dauerlarven angelockt werden. Über die chemische Natur dieser potentiellen Signalstoffe ist derzeit nichts bekannt.

Die aggregierte Verteilung der Nematoden bei den *M. melolontha*-Larven drückt sich auch in den großen Differenzen zwischen der Wahrscheinlichkeit der Erstpenetration und der Wahrscheinlichkeit der Zweit- und Folgepenetration aus (Abb. 3.28). Wie die Berechnungen mit der erweiterten Binomial-Verteilung zeigen, ist die Wahrscheinlichkeit der Erstpenetration lediglich bei den relativ anfälligen *Tenebrio*-Larven zur Vorhersage der Penetrationsrate geeignet, während bei *M. melolontha*-Larven hierfür nur die Wahrscheinlichkeit der Zweit- und Folgepenetration geeignet ist (Abb. 3.28, Tab. 3.7). Bereits während den Auszählungen war die aggregierte Verteilung zu erkennen: es waren stets viele

Wirte zu finden, die keine oder sehr wenige penetrierte Dauerlarven enthielten und nur wenige, die sehr viele enthielten.

Die Wahrscheinlichkeit der Erstpenetration spielt bei den wenig anfälligen *M. melolontha*-Larven nur bei sehr geringen Nematoden-Dichten, wie sie z.B. während der Selektion auf höhere Infektiosität bei *S. glaseri* erreicht wurden (Kapitel 4.4), eine Rolle. Die Anwendung der erweiterten Binomial-Verteilung ergab bei Hay & Fenlon (1995) mit der Wahrscheinlichkeit der Zweit- und Folgepenetration für Nematoden-Dichten von weniger als 10 Dauerlarven (*S. feltiae*) pro Wirt (Trauermückenlarven) die größten Abweichungen von der Binomial-Verteilung, bei höheren Dichten geht sie nach und nach vollständig in diese über.

4.4.11 Modell zu Beschreibung intraspezifischer Konkurrenz

Die intraspezifische Konkurrenz der Nematoden wurde anhand der Penetrationsrate bei verschiedenen Nematoden-Dichten abgeschätzt, bezieht sich also auf die Konkurrenz außerhalb des Wirts.

Im Testsystem I mit *Tenebrio*-Larven als Wirt konnte für keine der beiden Nematodenarten eine nennenswerte Konkurrenz nachgewiesen werden ($b < 1$; Abb. 3.29). Dagegen war im Testsystem I bei *M. melolontha*-Larven und im Testsystem II bei *Tenebrio*-Larven für *S. glaseri* ein Konkurrenzeffekt zu beobachten (Abb. 3.30 und 3.31). Die Größenordnung des Parameters b der Gleichung nach Bellows (1981) belief sich auf 1-2 und deutet daher eine Wettbewerbskonkurrenz zwischen den Dauerlarven an (vgl. Abschnitt 3.4.6). Die Konkurrenz kann auf gegenseitige Behinderung und/oder Störungen bei der Orientierung der Dauerlarven beruhen (vgl. Begon *et al.*, 1991; S. 347ff). Bei *H. bacteriophora* kann der vergleichsweise kleine Anteil infektiöser Dauerlarven für das Ausbleiben eines Konkurrenzeffektes verantwortlich sein (vgl. Abschnitt 4.4.3). Die Nematoden-Dichte ist jedoch einer von mehreren möglichen exogenen Faktoren, der Einfluss auf den Anteil infektiöser Dauerlarven innerhalb einer Dauerlarvenpopulation hat. Der geringe Anteil infektiöser Dauerlarven ist insofern in seiner Auswirkung einem Konkurrenzeffekt vergleichbar (vgl. Abb. 4.1).

Selvan *et al.* (1993a) ermittelten eine etwa gleich große Konkurrenz für das Penetrationsverhalten von *H. bacteriophora* und *S. carpocapsae* in *Galleria*-Larven. Mit zunehmenden Nematoden-Dichten wurde die relative Penetrationsrate und die Zahl überlebender Dauerlarven im Wirt geringer. Beide Effekte waren bei *S. carpocapsae* etwas ausgeprägter. Auch die Länge der sich entwickelnden adulten Nematoden und das Vermehrungspotential wurden mit zunehmender Dichte kleiner.

Alatorre-Rosas & Kaya (1990) untersuchten die interspezifische Konkurrenz von Nematoden der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema*. Sie fanden heraus, dass in einem Wirt, der von Nematoden aus beiden Gattungen befallen war, keine erfolgreiche Vermehrung stattfand.

Ein befallenes Insekt stellt eine räumlich und zeitlich begrenzte Nahrungs- und Entwicklungsressource für die Nematoden dar. Innerhalb eines Insektenkadavers ist daher die Nahrungskonkurrenz der entscheidende (= limitierender) Konkurrenzfaktor (vgl. Abschnitt 4.4.9).

4.5 Selektion auf höhere Infektiosität

Die Durchführung einer künstlichen Selektion erfordert bezüglich der zu selektierenden Merkmale eine genaue Umschreibung der Zuchtziele. In dieser Arbeit wurde versucht, die Infektiosität entomopathogener Nematoden gegenüber *M. melolontha*-Larven durch Selektion über Wirtspassagen zu erhöhen. Um ein genaues Kenntnis der limitierenden Parameter und damit der maßgebenden Merkmale der Nematoden für eine erfolgreiche Infektion zu erhalten, wurde die Infektionsbiologie der für die Selektion vorgesehenen Nematodenarten eingehend untersucht (Kapitel 4.3 und 4.4).

Die Selektion zur Verbesserung einzelner Merkmale in künstlichen Testsystemen kann durch indirekte Selektionserfolge zu unerwünschter Änderung anderer Merkmale und zu Anpassungserscheinungen der Population an die speziellen Testbedingungen führen. Gaugler & Campbell (1989a) konnten die Wirtsfindung eines *S. feltiae*-Hybridstammes durch Selektion erhöhen. Als Testsystem wurden Agaroseplatten verwendet. In Labor- und Feldversuchen zeigte die Selektionslinie im Vergleich zum Ausgangsstamm allerdings keine erhöhte Wirksamkeit. Die selektierten Nematoden sammelten sich zwar in höherem Ausmaß um die Insektenlarven an, penetrierten jedoch nicht. Darüber hinaus war die Selektionslinie weniger gut lagerfähig (Gaugler *et al.*, 1990; Gaugler *et al.*, 1991; Gaugler *et al.*, 1994).

Die Selektionswirkung und damit die realisierte Heritabilität ist in hohem Maß von der Umwelt, also dem Testsystem in dem die Selektion untersucht wird, abhängig. Diese Abhängigkeit beruht auf unterschiedlichen Genotyp-Umwelt-Interaktionen (Falconer, 1952; Falconer & Mackay, 1996; Schüler *et al.*, 2001). In Selektionsexperimenten bei Nutztieren wird daher stets angestrebt, die Umweltbedingungen den üblichen Haltungsbedingungen anzugleichen; nur dann ist eine Übertragbarkeit der Ergebnisse in die Praxis gewährleistet (Schüler *et al.*, 2001).

Übertragen auf entomopathogene Nematoden würde dies bedeuten, dass die Selektion in einem System erfolgen sollte, das dem späterem Einsatzgebiet der Nematoden entspricht bzw. sehr nahe kommt (z.B. im Gewächshaus, im Freiland). Vergleichbare Studien an EPN wurden bisher sehr selten durchgeführt. Tomalak (1994) führte eine Langzeitselektion des Nematoden *S. feltiae* über 34 Wirtspassagen auf erhöhte Wirksamkeit gegen Trauermückenlarven (*Lycoriella solani*, Sciaridae) direkt im Gewächshaus (Speisepilzanbau) durch. Die Experimente wurden im original Pilzsubstrat durchgeführt und ergaben eine um den Faktor 4 erhöhte Wirksamkeit der Selektionslinie. Die größten Selektionsfortschritte wurden innerhalb der ersten 8 Zyklen erzielt, danach war kaum noch ein Fortschritt zu verzeichnen.

Durch Selektion über 13 Zyklen konnten Gaugler & Campbell (1989a) die Wirtsfindung von *S. feltiae* um den Faktor 20-27 steigern, die realisierte Heritabilität betrug 0,64. Griffin & Downes (1994) konnten über 9 Selektionszyklen die Infektiosität bei niedrigen Temperaturen von *H. megidis* steigern. Die Temperatur, bei der 50% der *Tenebrio*-Larven infiziert wurden, konnte von 10°C auf 5°C reduziert werden, die realisierte Heritabilität betrug 0,33.

Durch die Selektion auf höhere Infektiosität gegen *M. melolontha*-Larven (L3) über Wirtspassagen konnte in der vorliegenden Arbeit für die Nematodenart *H. bacteriophora* keine stabile Steigerung der Infektiosität erreicht werden, die ermittelte realisierte Heritabilität ($h_r^2 \approx 0,3$) unterschied sich nicht signifikant von null (Abschnitt 3.5.1). Die größten Selektionsfortschritte wurden in den ersten drei Selektionszyklen festgestellt (Steigerung um den Faktor 2-3), danach konnte keine Steigerung mehr erzielt werden. Dagegen konnte für die Art *S. glaseri* eine stabile erhöhte Infektiosität (Steigerung etwa um den Faktor 20-27 nach 8-9 Zyklen) erzielt werden, die realisierte Heritabilität belief sich auf etwa 0,70. Im Folgenden sollen die unterschiedlichen Selektionswirkungen mit Hilfe der Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Infektionsbiologie erklärt werden. Die Ergebnisse und die postulierten Schlussfolgerungen sind in Abb. 4.2 schematisch zusammengefasst.

4.5.1 Exo- und endogene Faktoren sorgen bei *H. bacteriophora* dafür, dass jeweils nur ein Teil der Dauerlarvenpopulation in einem „infektiösem Zustand“ ist

Für die Art *H. bacteriophora* wurde in allen Fällen ein deutlich kleinerer Anteil penetrierender Nematoden ermittelt als für *S. glaseri* (bei *M. melolontha*-L3-Larven z.B. < 1% im Vergleich zu 14%; Abschnitt 3.4.2, Tab. 3.6).

Die starken Schwankungen der Selektionsfortschritte und die Ergebnisse der Versuche zur phasenweisen Infektiosität (Abschnitt 3.4.2) zeigen, dass die Wirksamkeit von *H. bacteriophora* im Vergleich zu *S. glaseri* in höherem Maß von Umweltbedingungen (= exogene Faktoren) und physiologischen (= endogenen) Faktoren beeinflusst wird. Wichtige Umweltbedingungen sind die Temperatur, die Bodenfeuchtigkeit und vor allem der Zustand der Wirtsinsekten, wie z.B. die Vorinfektion mit einem weiteren Pathogen, Häutungen und das Larvenstadium. Ein bedeutender Faktor ist die Nematoden-Dichte im Substrat.

Innere Faktoren sind z.B. das Alter der Dauerlarven, das Fettdepot und die Anzahl eingelagerter symbiotischer Bakterien pro Dauerlarve. Die inneren Faktoren hängen wiederum von äußeren Faktoren während der Entwicklung, Vermehrung und Lagerung der Nematoden ab und sind wichtige Qualitätskriterien einer Nematoden-Charge. Geringfügige

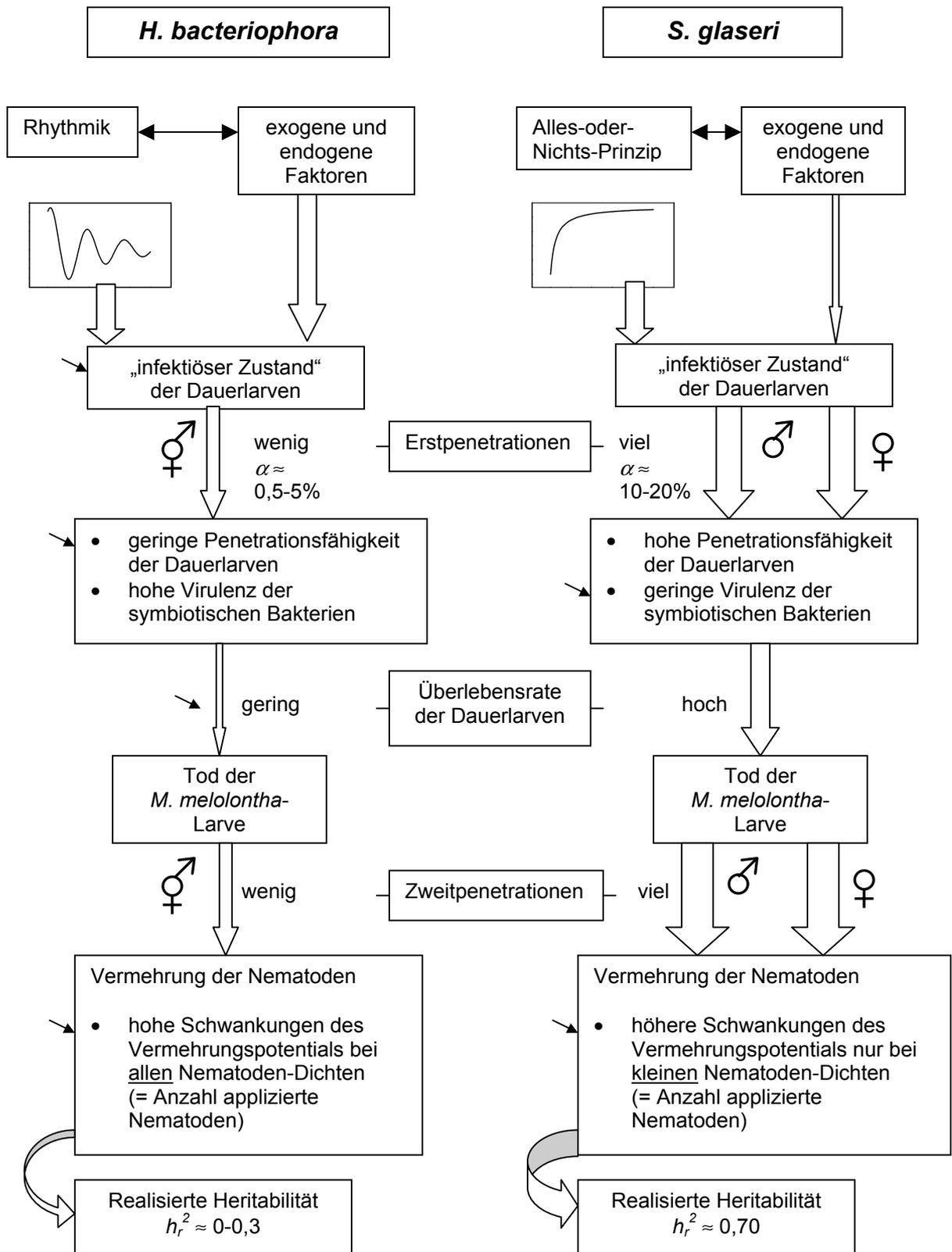


Abb. 4.2. Schematische Darstellung der Ergebnisse der Untersuchungen zur Infektionsbiologie, die zur Erklärung der unterschiedlichen Selektionswirkungen bei den Nematodenarten *H. bacteriophora* und *S. glaseri* während der Selektion auf höhere Infektiosität gegen *M. melolontha*-Larven über Wirtspassagen beitragen. Die Breite der Blockpfeile entspricht der Gewichtung des jeweiligen Faktors. Pfeile (↘) deuten auf limitierende Faktoren für die Selektion. Siehe auch Abb. 4.1.

Änderungen der genannten Faktoren während der Biotests sind möglicherweise (teilweise) für die variable Wirksamkeit der einzelnen Nematoden-Chargen verantwortlich (vgl. Abschnitt 4.4.3).

Die genannten exo- und endogenen Faktoren sorgen bei *H. bacteriophora* auf natürliche Weise dafür, dass zu einem bestimmten Zeitpunkt sich jeweils nur ein kleiner Teil der Population in einem „infektiösem Zustand“ befindet.

Als weitere mögliche Mechanismen für diese Regulation kann eine endogene Rhythmik des physiologischen Zustands der Dauerlarven sowie die dichteabhängige Wirkung von Pheromonen zwischen den Dauerlarven in Betracht gezogen werden (vgl. Abschnitt 4.4.3, Abb. 4.1).

4.5.2 *S. glaseri* agiert eher nach dem „Alles-oder-Nichts“-Prinzip

Im Gegensatz zu *H. bacteriophora* agiert die Art *S. glaseri* eher nach dem „Alles-oder-Nichts“-Prinzip (Abb. 4.2). Ein weitaus größerer Anteil der Dauerlarvenpopulation penetriert in ein verfügbares Insekt (vgl. Abschnitt 4.4.2). Durch mehrfaches Einsetzen von Insekten in ein Bodensubstrat, das Nematoden enthielt, konnte in relativ kurzer Zeit die gesamte *S. glaseri*-Population geködert werden, während für *H. bacteriophora* die Infektionsrate über längere Zeit konstant blieb bzw. starken Schwankungen unterworfen war (vgl. Abschnitt 3.4.2, Abb. 3.13 und 3.14 sowie Abschnitt 4.4.3).

4.5.3 Die Eigenart der Befallsstrategie von *H. bacteriophora* verhinderte die Stabilisierung einer höheren Infektiosität durch Selektion

Im Folgenden sollen die Faktoren der Befallsstrategie von *H. bacteriophora*, welche einen Selektionserfolg verhinderten, zusammenfassend erläutert werden.

Nur ein geringer Teil der Dauerlarvenpopulation von *H. bacteriophora* dringt in eine *M. melolontha*-Larve ein. Aufgrund der vergleichsweise geringen Resistenz von Dauerlarven gegenüber dem Immunsystem und den aggressiven Bedingungen des Darmmilieus der Larve überlebt nur ein sehr kleiner Teil der penetrierten Dauerlarven und gelangt in das Hämocoel. Im Hämocoel sterben weitere Dauerlarven, die allerdings relativ schnell, unter Umständen auch nach ihrem Tod, die hoch virulenten symbiotischen Bakterien freigeben. Die Bakterien bewirken den schnellen Tod der Larve. Nach dem Tod der Larve penetrierte Dauerlarven haben eine geringere Ausfallquote und finden in der toten Larve optimale Bedingungen vor. Mutmaßlich vermehren sich daher in erster Linie die Dauerlarven, welche sekundär (nach

dem Tod bzw. nach Schwächung der Larve) penetriert sind. Diese Dauerlarven werden aber dem Selektionskriterium „höhere Infektiosität“ nur in geringerem Maß gerecht.

Auch die Zahl der sekundär penetrierenden Dauerlarven ist vergleichsweise gering und vom Anteil der Dauerlarven, die sich gerade in einem „infektiösen Zustand“ befinden, abhängig. Das erheblich variierende Vermehrungspotential und der zeitweise hohe Anteil an infizierten *M. melolontha*-Larven mit typischer Verfärbung, aber ausbleibender Vermehrung der Nematoden belegen, dass zum Großteil die penetrierten Dauerlarven zwar den Tod der Larve verursachten, aber selbst nicht überlebten. Die hohen Schwankungen des Vermehrungspotentials waren unabhängig von der Zahl der applizierten Nematoden, d.h. hohe Dosierungen erhöhten zwar die Mortalität unter den *M. melolontha*-Larven, aber nicht den Anteil infizierter Larven mit erfolgreicher Nematodenvermehrung.

Die sukzessive Vermehrung von *H. bacteriophora* in *M. melolontha*-Larven führte zu geringfügig aber signifikant kleineren Dauerlarven (Abschnitt 3.5.2, Tab. 3.11). Dauerlarven, die sich in *Galleria*-Larven entwickelten, waren etwas größer als Dauerlarven aus *M. melolontha*-Larven. *M. melolontha*-Larven sind offenbar für *H. bacteriophora* auf längere Sicht keine optimale Nahrungs- und Vermehrungsressource. Dies würde auch die in allen Wiederholungen der Selektion beobachteten größeren Selektionserfolge in den ersten drei Selektionszyklen erklären. Möglicherweise wurde die genetische Selektion der ersten Selektionszyklen während der folgenden Zyklen nach und nach durch suboptimale Ernährungsbedingungen (also durch umweltbedingte Effekte) überlagert.

Die phänotypische Varianz der Dauerlarvenlänge bei *H. bacteriophora* reicht von 512 bis 671 μm (Mittelwert = 588 μm) (Poinar, 1990). Der Ausgangsstamm (HYB) hatte eine mittlere Länge von 625 μm , die Selektionslinie H1-14 von 604 μm . Dies entspricht einer Abnahme von etwa 3-4%. Aufgrund dieser relativ geringen Änderungen wurde die Länge der Dauerlarven bei *H. bacteriophora* nicht weiter untersucht.

4.5.4 Die Befallsstrategie von *S. glaseri* erlaubte die sukzessive Erhöhung der Selektionsintensität und führte zur Stabilisierung einer höheren Infektiosität

Bei der Art *S. glaseri* dringen von vornherein mehr Dauerlarven in eine potentiell zur Verfügung stehende *M. melolontha*-Larve ein. Die Überlebensrate dieser Dauerlarven ist aufgrund der höheren Resistenz gegenüber dem Immunsystem und den aggressiven Bedingungen des Darmmilieus der Larve wesentlich höher als bei *H. bacteriophora*. Die relativ geringe Virulenz der symbiotischen Bakterien erfordert das Eindringen mehrerer Dauerlarven um eine Larve abzutöten. Der höhere Anteil (Abschnitt 3.4.2 und 4.4.2) und die

hohe Überlebensrate (Abschnitt 3.4.3) penetrierter Dauerlarven ermöglichte die sukzessive Erhöhung der Selektionsintensität, indem die Zahl der applizierten Nematoden reduziert wurde. Durch die hohe Überlebensrate der zuerst penetrierten Nematoden war gewährleistet, dass sich diese, dem Selektionskriterium am stärksten entsprechenden Dauerlarven, auch vermehrten.

Durch die geschlechtliche Differenzierung der Dauerlarven wirkte die Selektion in jedem Zyklus gleichzeitig auf beide Geschlechter (vgl. Abschnitt 1.2.1, Abb. 1.2 und Abb. 4.2); die Selektionsfortschritte wurden dadurch wahrscheinlich zusätzlich forciert. Stuart *et al.* (1998) konnten bei *S. glaseri* nachweisen, dass weder in der Infektionsdynamik noch im Zahlenverhältnis nach der Penetration zwischen männlichen und weiblichen Dauerlarven ein Unterschied bestand (vgl. auch Bohan & Hominick, 1997b).

Die beiden unabhängigen Wiederholungen der Selektion führten zu nahezu identischen Ergebnissen. Die Variabilität zwischen den Wiederholungen einer Selektion ist auf genetische Drift zurückzuführen, die auf zufälligen Veränderungen der Allelfrequenzen bei begrenzter Populationsgröße beruht (Schüler *et al.*, 2001).

4.5.5 Ein direkter Vergleich der realisierten Heritabilitäten ist nur bedingt möglich

Die vergleichsweise hohe realisierte Heritabilität der Infektiosität bei *S. glaseri* ist eine unmittelbare Folge der sukzessiv erhöhten Selektionsintensität, da der Heritabilitätskoeffizient eine nahezu lineare Abhängigkeit zur Selektionsintensität zeigt (Meyer & Enfield, 1975; Schüler *et al.*, 2001). Diese Abhängigkeit setzt die Einhaltung gleicher Selektionsintensitäten voraus, wenn die Ergebnisse verschiedener Experimente verglichen werden sollen.

Die Selektionsintensität für *H. bacteriophora* konnte aufgrund der geschilderten Umstände nicht erhöht werden. Ein direkter Vergleich der realisierten Heritabilitäten bei beiden Nematodenarten ist daher nur bedingt möglich. Die Abschätzungen reflektieren im wesentlichen die unterschiedlichen Befallsstrategien der beiden Arten.

4.5.6 Wurde ein Selektionsplateau erreicht?

Für das Auftreten eines Selektionsplateaus sind die wichtigsten Gründe: (1) Verringerung / Erschöpfung der additiv-genetischen Varianz, (2) Überdominanz oder Selektionsvorteil von Heterozygoten, (3) gegensätzliche Wirkung von künstlicher und natürlicher Selektion, (4) negative genetische Merkmalskorrelationen, (5) Genotyp-Umwelt-Interaktionen (vgl. Robertson, 1960; Schüler *et al.*, 2001).

Der Verlauf der Selektionserfolge bei *H. bacteriophora* (Abb. 3.32) lässt zwei Interpretationen zu: (1) Es wurde ein sehr frühes Selektionsplateau erreicht und durch suboptimale Entwicklungsbedingungen kam es im weiteren Verlauf der Selektion zu keinen weiteren Selektionserfolgen mehr. (2) Es wurde kein Selektionsplateau erreicht und die Selektionserfolge wurden in erster Linie durch die hohe Umweltvarianz bestimmt.

Die Heritabilität eines Merkmals ändert sich während der Selektion, da sich auch die Population selbst verändert. Bei hohen Heritabilitäten ($> 0,5$) und hoher Selektionsintensität (Remontierungsrate $\leq 5\%$) nimmt der Selektionserfolg in der zweiten Generation (= Zyklus) im Vergleich zur ersten bereits um etwa 20% ab (Falconer & Mackay, 1996, S. 203). Da aufgrund der geringen Penetrationsaktivität von *H. bacteriophora* die Selektionsintensität hoch ist, könnten die hohen Selektionserfolge der ersten Generationen tatsächlich ein Hinweis darauf sein, dass eine hohe Heritabilität des Merkmals „Infektiosität“ gegenüber *M. melolontha*-Larven vorliegt, die zu einer relativ schnellen Erschöpfung der additiv-genetischen Varianz führte. Demnach wurde ein frühes Selektionsplateau erreicht und die hohe umweltbedingte Varianz inklusive der suboptimalen Ernährungsbedingungen in *M. melolontha*-Larven bewirkte die Fluktuationen in den folgenden Zyklen. Die wahrscheinlichste Interpretation kombiniert beide Schlussfolgerungen.

Dagegen legt der Verlauf der Selektionserfolge bei *S. glaseri* das Erreichen eines Selektionsplateaus nach etwa 8-9 Selektionszyklen nahe (Abb. 3.38; James, 1962). Dies könnte mit der raschen Erhöhung der Selektionsintensität zusammenhängen, die zu einer schnelleren Fixierung entsprechender Genorte führte. Fixierte Genorte tragen nicht mehr zur additiv-genetischen Varianz bei (Schüler *et al.*, 2001). Weder über die Zahl noch über die Art der betroffenen Genorte ist etwas bekannt. Es können daher auch keine Aussagen über etwaige Kopplungen von Genen getroffen werden.

Besonders bei kleinen Populationen wirkt häufig die natürliche Selektion der künstlichen Selektion entgegen (vgl. Curtsinger, 1986). Werkmeister (1967) stellte bei Selektionsversuchen an *Drosophila* fest, dass mit abnehmender Remontierungsrate, also zunehmender Selektionsintensität, die realisierte Heritabilität stärker vom Erwartungswert abweicht. Als Ursache vermutet der Autor den Einfluss natürlicher Selektion. Auch der Einfluss (zufälliger) genetischer Drift nimmt mit abnehmender Populationsgröße zu (Werkmeister, 1967; Falconer & Mackay, 1996).

In den vorliegenden Selektionsexperimenten dürfte das reduzierte Vermehrungspotential der Selektionslinie von *S. glaseri*, also ein typisches Fitness-Merkmal, für das Ausbleiben weiterer Selektionserfolge verantwortlich sein. Die Frage, ob die infektiöseren Nematoden ein

geringeres Vermehrungspotential besitzen, d.h. ob die Merkmale Infektiosität und Vermehrungspotential eine negative genetische Korrelation aufweisen, lässt sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit mangels Daten und wegen der großen Umweltvarianz der Merkmale nicht beantworten. Stuart & Gaugler (1996) konnten tatsächlich eine signifikante negative Korrelation zwischen der Infektiosität und dem Vermehrungspotential (bei Vermehrung in *Galleria*-Larven) bei *S. glaseri* nachweisen (vgl. Abschnitt 4.5.7).

4.5.7 Kam es während der Selektion zu Inzuchtdepressionen? Als Kriterium wurde das Vermehrungspotential der Selektionslinien untersucht

Der bekannteste mit Inzucht einhergehende Effekt ist die Reduzierung der Mittelwerte von Fitness- und Reproduktionsmerkmalen, gemeinhin als Inzuchtdepression bezeichnet (Tantawy & Reeve, 1956). Dieser Effekt beruht auf zunehmender Homozygotie und abnehmender Heterozygotie (Falconer & Mackay, 1996). Als Kriterium für eine etwaige Inzuchtdepression der Selektionslinien wurde deren Vermehrungspotential mit dem des Ausgangsstammes verglichen. Da das Vermehrungspotential auch von der Nematoden-Dichte und der Länge der Dauerlarven abhängt, wurden diese Parameter mit berücksichtigt.

Für *H. bacteriophora* konnte das Vermehrungspotential der Selektionslinie H1-14 in *M. melolontha*-Larven nach vorheriger Zwischenvermehrung in *Galleria*-Larven nicht ermittelt werden, da es in allen infizierten Larven ($n = 34$), unabhängig von der Anzahl applizierter Nematoden, zu keiner Vermehrung der Nematoden kam. Die parallele Untersuchung des Vermehrungspotentials in *Tenebrio*-Larven zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen der Selektionslinie und dem Ausgangsstamm (Daten nicht dargestellt).

Aufgrund der Vermehrungsweise und der Befallsstrategie von *H. bacteriophora* (vgl. Abb. 1.2), die es ermöglichen, dass eine einzige zu einer Hermaphrodite weiterentwickelte Dauerlarve die nächste Generation hervorbringt, ist zu erwarten, dass die Art durch die Wirkung natürlicher Selektion relativ resistent gegenüber Inzuchtdepressionen ist. Das Phänomen der Überlegenheit von ingezüchteten Teilpopulationen beruht darauf, dass die Frequenz des besseren Homozygoten in der nicht ingezüchteten Ausgangspopulation unterhalb der Gleichgewichtsfrequenz liegt (Schüler *et al.*, 2001). Da natürliche Inzucht zur Überlebensstrategie von *H. bacteriophora* gehört, ist davon auszugehen, dass die Art durch natürliche Selektion bereits zum besseren (überlegenen) Homozygoten gemacht wurde. Graustein *et al.* (2002) konnten in *C. elegans* und *C. briggsae* - beide Arten vermehren sich hauptsächlich über Hermaphroditen - eine wesentlich geringere genetische Variabilität zweier Kerngene nachweisen als in *C. remanei*, einer Art, die sich geschlechtlich vermehrt. Die

Autoren erklären den geringeren genetischen Polymorphismus dieser Arten durch die natürliche Inzucht und die Wirkung natürlicher Selektion (vgl. Kapitel 4.6).

Bei *S. glaseri* hatte die Selektionslinie im Vergleich zum Ausgangsstamm ein vermindertes Vermehrungspotential. Aufgrund der enormen Schwankungen des Vermehrungspotentials zwischen einzelnen *M. melolontha*-Larven konnte jedoch trotz deutlicher Tendenz keine Signifikanz ermittelt werden (Abb. 3.49). Das Vermehrungspotential war mit der Nematodendichte (= Anzahl applizierter Nematoden) und mit der Länge der Dauerlarven nur schwach negativ korreliert (Abb. 3.44). Eine Erklärung der Verminderung des Vermehrungspotentials allein durch diese Effekte reicht daher nicht aus.

Die Art *S. glaseri* versucht durch ihre Befallsstrategie („Alles-oder-Nichts-Prinzip“; vgl. Abschnitt 4.5.2) eine Inzucht zu vermeiden und maximale genetische Rekombination zu erreichen, indem möglichst viele Dauerlarven in einen potentiell zur Verfügung stehenden Wirt eindringen. Die Art dürfte aufgrund ihrer rein geschlechtlichen Vermehrung gegenüber einer Inzuchtdepression weitaus anfälliger sein.

Einen Beweis für die Anfälligkeit gegenüber Inzuchtdepression und Gründereffekten (engl. *founder effect*) von *S. glaseri* konnten Stuart & Gaugler (1996) erbringen. Die Autoren erzeugten durch Kreuzung mehrerer Stämme einen Hybrid mit großer genetischer Variabilität. Dieser Hybrid wurde über 12 Passagen in *Galleria*-Larven oder *P. japonica*-Larven vermehrt und in mehrere unabhängige Linien aufgeteilt. Bei drei Linien wurde die genetische Variabilität durch einen anfänglichen „Flaschenhals“ (engl. *bottleneck*) eingeeengt, indem nur 10 Dauerlarven pro *Galleria*-Larve appliziert wurden. Alle Linien wurden am Ende hinsichtlich ihrer Infektiosität, ihres Vermehrungspotentials und des Anteils von Männchen an der Gesamtpopulation untersucht. In allen Linien konnte im Vergleich zur Basispopulation eine Zunahme der Infektiosität, des Vermehrungspotentials und des Anteils an Männchen beobachtet werden. Die Autoren erklären diese Beobachtung mit einer Anpassung der Linien an die Laborbedingungen. Die geringsten Unterschiede zur Basispopulation wiesen zwei der drei „Flaschenhals-Linien“ auf. Diese Beobachtung führen die Autoren auf den Gründereffekt bei diesen Linien zurück. In der vorliegenden Arbeit könnte die Reduzierung der Anzahl applizierter Nematoden auf bis zu 8-16 Dauerlarven pro *M. melolontha*-Larve über mehrere Zyklen demnach eine (geringe) Inzuchtdepression bewirkt haben.

Selvan *et al.* (1993c) verglichen die Wirksamkeit von bereits seit längerem im Labor gehaltenen Stämmen mit der von frisch isolierten Stämmen bei *H. bacteriophora* und bei *S. glaseri*. Die frisch isolierten Stämme hatten bei beiden Arten sowohl unter Labor- als auch unter (simulierten) Feldbedingungen eine höhere Wirksamkeit gegenüber Larven von *P.*

japonica, die Unterschiede waren jedoch nur für die Laborbedingungen signifikant. Die Autoren schließen daraus auf die nachteiligen Auswirkungen längerfristiger Laborzucht, wenn keine genetische Auffrischung durch Einkreuzung neuer Isolate erfolgt. Das Ausbleiben einer signifikant höheren Wirksamkeit der frisch isolierten Stämme unter Feldbedingungen führen die Autoren auf zweierlei Ursachen zurück: (1) die weitaus höhere Umweltvarianz unter den Feldbedingungen bewirkte in allen Stämmen hohe Schwankungen, (2) während der dreiwöchigen Versuchsperiode könnte eine „Anpassung“ (= Selektion) der Laborstämme an die Feldbedingungen stattgefunden haben.

Bei der Interpretation einer etwaigen Inzuchtdepression ist auch zu berücksichtigen, dass der in dieser Arbeit verwendete *S. glaseri*-Stamm (NC) schon einige Jahre im Labor gehalten wurde (Koppenhöfer, 1999; pers. Mitteilung). Dieser Umstand hat mit hoher Wahrscheinlichkeit zur Verminderung der genetischen Variabilität und zur Anpassung des Stammes an Laborbedingungen geführt, so dass auch aus diesem Grund von einer höheren Anfälligkeit für Inzuchtdepression ausgegangen werden kann.

4.5.8 Die einmalige Vermehrung in *M. melolontha*-Larven bewirkte bereits eine Wirkungssteigerung

Für beide Nematodenarten konnte nachgewiesen werden, dass die einmalige Vermehrung in *M. melolontha*-Larven zu einer Wirkungssteigerung führte (Abschnitt 3.3.1, Tab. 3.2 und Abschnitt 3.5.1).

Bei *H. bacteriophora* führte, nach einer Zwischenvermehrung in *Galleria*-Larven, die einmalige Vermehrung der Selektionslinie in *M. melolontha*-Larven zu einer Wirkungssteigerung um den Faktor 6 (vgl. Tab. 3.2). Dieser Befund stimmt mit der Beobachtung überein, dass die größten Wirkungszunahmen bei *H. bacteriophora* meist nach dem ersten Selektionszyklus erzielt wurden.

Inwieweit der „Wirtswechsel“ selbst als Faktor für eine kurzfristige Wirkungszunahme von *H. bacteriophora* eine Rolle spielt, bleibt offen. Einige Beobachtungen sprechen jedoch dafür, dass ein Wirtswechsel und auch der Wechsel von der Vermehrung in künstlichen Medien auf die Vermehrung in einem Wirtsinsekt eine Wirkungssteigerung mit sich bringt.

Bei *H. bacteriophora* (PS7) konnte mit einer Charge, die auf Wouts-Agar vermehrt wurde, in keinem Fall die Infektion einer *M. melolontha*-Larve erreicht werden. Erst nach einer Zwischenvermehrung in *Galleria*-Larven wirkte der Stamm besser (Daten nicht dargestellt). Die gleiche Beobachtung wurde für den in Flüssigkultur vermehrten Stamm HYB gemacht. Ähnliche Beobachtungen sind von Freilandapplikationen der Nematoden bekannt. Auch hier

wirken meist die Nematoden, die sich bereits einmal im Zielinsekt vermehren konnten, besser als die direkt applizierten Nematoden (Sulistyanto & Ehlers, 1996; Ehlers & Peters, 1998; vgl. Kapitel 4.1).

Für *S. glaseri* führte die einmalige Vermehrung in *M. melolontha*-Larven zu einer Wirkungssteigerung, die der nach 10 Selektionszyklen erreichten entsprach (Tab. 3.2). Dieser große Unterschied in Abhängigkeit vom Vermehrungswirt bestand jedoch nur beim Ausgangsstamm, während die Wirkung der Selektionslinie unabhängig vom Vermehrungswirt gleich hoch blieb (Tab. 3.2). Dieses Ergebnis lässt zweierlei Schlüsse zu.

Zum einen scheinen optimale Ernährungsbedingungen für *S. glaseri* in *M. melolontha*-Larven bereits zu einer enormen, modifikatorischen Wirkungssteigerung der Dauerlarven zu führen. Eine wichtige Rolle in der Ernährung der Nematoden kommt den Lipiden zu, die daher in einem eigenen Abschnitt behandelt werden (4.5.11).

Die zweite Schlussfolgerung bezieht sich auf das Ausbleiben des ernährungsbedingten Effekts bei der Selektionslinie. Dies belegt, dass für die Selektionslinie die physiologischen Parameter einen geringeren Einfluss auf die Infektiosität ausübten, also eine kleinere modifikatorische Variabilität vorlag. Dies wiederum könnte die Folge der durch die Selektion bedingten genetischen Fixierung einiger Anlagen sein, die zur Steigerung der Infektiosität einer Dauerlarve beitragen.

4.5.9 Die Selektion führte bei *S. glaseri* zu längeren Dauerlarven

Die sukzessive Vermehrung von *S. glaseri* in *M. melolontha*-Larven führte zu signifikant längeren Dauerlarven, die auch nach sieben Generationen ohne Selektionsdruck (Vermehrung in *Galleria*-Larven) signifikant länger als Dauerlarven des Ausgangsstammes waren (Abschnitt 3.5.2, Tab. 3.10). Die phänotypische Korrelation zwischen der Länge der Dauerlarven und deren Infektiosität war jedoch nahezu null (Abb. 3.45). Dagegen konnten Gerritsen *et al.* (2000; pers. Mitteilung) bei vergleichbaren Untersuchungen (siehe unten) zwischen der Länge der Dauerlarven und deren Infektiosität eine positive Korrelation feststellen. Ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist jedoch nur bedingt möglich. Der Hauptgrund, warum keine Korrelation zwischen Länge und Infektiosität der Dauerlarven nachgewiesen werden konnte, ist darin zu sehen, dass die Zahl der applizierten Nematoden von Zyklus zu Zyklus reduziert wurde, während die Länge der Dauerlarven sich bereits nach dem 2.-3. Zyklus stabilisierte (Tab. 3.10). Die Mortalitätswerte wurden zwar stets auf eine Dauerlarve umgerechnet, doch überwog der Effekt der

Reduzierung der Dosis den Effekt der Längenzunahme der Dauerlarven. Bei konstant gehaltener Dosis wäre wahrscheinlich ebenfalls eine positive Korrelation gefunden worden. Dauerlarven, die sich in *M. melolontha*-Larven entwickelten, wiesen ein größeres Fettdepot auf, als Dauerlarven, die sich in *Galleria*-Larven entwickelten. Der Unterschied war für die Selektionslinie signifikant, nicht jedoch für den Ausgangsstamm (Abb. 3.47). Demzufolge führten die durch die Selektion genetisch fixierten Anlagen für größere Dauerlarven in Kombination mit optimalen Ernährungsbedingungen der Art in *M. melolontha*-Larven zu dem signifikant erhöhten Fettdepot (weitere Betrachtungen zum Fettdepot siehe Abschnitt 4.5.11). Gerritsen *et al.* (2000; pers. Mitteilung) führten vergleichbare Untersuchungen zur Steigerung der Infektiosität eines *S. glaseri*-Stammes gegenüber *M. melolontha*-Larven (L3) durch. Sowohl in Bezug auf die Steigerung der Selektionsintensität und der Infektiosität als auch in Bezug auf die Längenzunahme der Dauerlarven und deren genetische Fixierung erhielten sie Ergebnisse, die mit denen der vorliegenden Arbeit übereinstimmen. Die Selektionslinie nach 5 Selektionszyklen erwies sich im Vergleich zum Ausgangsstamm auch in einem Feldversuch als überlegen.

Das Vermehrungspotential war trotz Verringerung der Anzahl applizierter Nematoden weniger starken Fluktuationen als bei *H. bacteriophora* unterworfen. Im Bereich von 8-32 applizierten Nematoden pro *M. melolontha*-Larve waren jedoch häufiger infizierte Larven ohne Nematodenvermehrung zu beobachten, d.h. in diesem Bereich scheint hinsichtlich der optimalen Erschließung der Larve als Nahrungs- und Entwicklungsressource ein Grenzbereich erreicht zu sein (vgl. Abb. 3.40). Dieser Effekt lässt sich durch die anfänglich relativ geringe Zahl an symbiotischen Bakterien im Hämocoel des Insekts erklären, wenn nur sehr wenig Dauerlarven penetriert sind. Dies führt zu schlechten Startbedingungen und erleichtert das Aufkommen von Fremdkeimen. Die geringere Wahrscheinlichkeit des für die Vermehrung notwendigen räumlich-zeitlichen Zusammentreffens genügend männlicher und weiblicher Dauerlarven dürfte ebenfalls eine Rolle spielen.

4.5.10 *S. glaseri* zeigt eine große phänotypische Varianz der Länge der Dauerlarven

Die Länge der Dauerlarven ist ein erster Anhaltspunkt für die Artbestimmung bei EPN. Für den Längenbereich der Dauerlarven von *S. glaseri* gibt Poinar (1990) 864 bis 1448 μm (Mittelwert = 1130 μm) an. Die phänotypische Varianz des Merkmals Länge ist bei dieser Art also relativ groß. Die Dauerlarven der drei in dieser Arbeit verwendeten Stämme wiesen folgende mittlere Längen auf: NC – 1159 μm , RS92 – 1081 μm , NJH – 1569 μm (Tab. 3.10). Demzufolge scheint der in der Literatur angegebene Längenbereich zu eng gefasst. Die

mittlere Länge der Selektionslinie (Ausgangsstamm = NC) stabilisierte sich in einem Bereich zwischen 1350 und 1450 μm (Tab. 3.10). Dies entspricht einer Zunahme von 16-25%. Die Länge der Dauerlarven ist von den Ernährungsbedingungen während der Entwicklung abhängig. So ergab bereits die einmalige Vermehrung von *S. glaseri* in *M. melolontha*-Larven größere Dauerlarven (Abschnitt 4.5.9). Die zunehmende Selektionsintensität während der Selektion auf höhere Infektiosität führte jedoch anscheinend auch zu einer genetischen Fixierung dieser Eigenschaft. So ergab die F1 einer Rückkreuzung der Selektionslinie mit dem Ausgangsstamm eine im Vergleich zu beiden Elternpopulationen leicht erhöhte intermediäre mittlere Länge. Diese Zunahme könnte auf einer geringen positiven Heterosis (= +42 μm = +3,2%; Tab. 3.10) oder, wie die Häufigkeitsverteilung der Längen der F1 andeutet, auf geringer (partieller) Dominanz einiger der beteiligten Genloci beruhen.

Der intermediäre Erbgang bei der F1 kann als weiteres Indiz für die genetische Fixierung der Anlagen für längere Dauerlarven angesehen werden. Der kleine (potentielle) Heterosis-Effekt weist darauf hin, dass die Allelfrequenzdifferenzen zwischen der Selektionslinie und dem Ausgangsstamm relativ klein sind, d.h. die Zahl der in der Selektionslinie fixierten Genloci ist im Vergleich zum Ausgangsstamm gering (Falconer & Mackay, 1996). Die relativ schnelle Fixierung kann bedingt sein durch: (1) die im Laufe der Selektion immer kleiner werdende Populationsgröße, (2) die Beteiligung von nur wenigen Genloci, (3) relativ große Allelfrequenzen innerhalb der Ausgangspopulation (vgl. Schüler *et al.*, 2001).

Aus der Kreuzung der Stämme NC und NJH resultierten dagegen Dauerlarven, die die mittlere Länge beider Elternstämme übertrafen (1628 μm). Die starke positive Heterosis (= +264 μm = +19,4%; Tab. 3.10) weist auf eine größere Allelfrequenzdifferenz zwischen diesen beiden Stämmen hin.

Ob die Länge der Dauerlarven auch nach weiteren Generationen ohne Selektionsdruck konstant bliebe, wäre zu prüfen. Wäre dies der Fall, könnte davon ausgegangen werden, dass die Anlagen für längere Dauerlarven durch die Selektion vollständig oder zum Großteil fixiert wurden, d.h. dass die einzelnen Allele homozygot sind. Würde sich dagegen die Länge der Dauerlarven (relativ schnell) wieder auf das ursprüngliche Niveau einpendeln, wäre das ein Hinweis darauf, dass die Anlagen noch nicht vollständig fixiert waren. Die Rückführung der Allelfrequenzen auf die ursprünglichen Frequenzen (= vor der künstlichen Selektion) durch die Wirkung natürlicher Selektion wird als genetische Homöostasie bezeichnet (Falconer & Mackay, 1996).

4.5.11 *S. glaseri* zeigt ernährungsphysiologische Anpassungen an Scarabaeiden-Larven, eine Schlüsselrolle kommt den Lipiden zu

In der Selektionslinie legten die längeren Dauerlarven nach der Vermehrung in *M. melolontha*-Larven ein signifikant größeres Fettdepot an (gemessen anhand der Triglyceride; vgl. Abschnitt 3.5.2, Abb. 3.47). Hatab *et al.* (1998) konnten ebenfalls nachweisen, dass Dauerlarven von *S. glaseri* nach der Vermehrung in *Popillia japonica* (Scarabaeidae) ein signifikant erhöhtes Fettdepot anlegten. Als Vergleich dienten Dauerlarven, die sich in *Galleria*-Larven oder künstlichen Fest- und Flüssigmedien entwickelt hatten. Darüber hinaus stellten die Autoren fest, dass sich der Anteil der einzelnen Fettkomponenten (z.B. Mono-, Di- und Triacylglycerine, freie Fettsäuren, Sterine) in Abhängigkeit vom Ernährungsmedium änderte. Bei Dauerlarven, die sich in *P. japonica*-Larven entwickelt hatten, war Ölsäure die häufigste Fettsäure; diese Fettsäure ist die häufigste Fettsäure in *P. japonica*-Larven. Dauerlarven, die sich in den künstlichen Medien entwickelt hatten, enthielten hauptsächlich Linolsäure, die im Maisöl enthalten war, das dem Medium zugegeben wurde. Die quantitativen Änderungen gehen also mit qualitativen Änderungen des Fettdepots einher und spiegeln wahrscheinlich stoffwechselphysiologische Anpassungen (Bedürfnisse) wider (Hatab *et al.*, 1998). Vergleichbare qualitative Effekte sind auch bei der Vermehrung von *S. glaseri* in *M. melolontha*-Larven zu erwarten. Inwieweit diese qualitativen Änderungen einen Einfluss auf die Infektiosität und andere Eigenschaften, z.B. Langlebigkeit, der Dauerlarven haben, ist noch unbekannt, im Hinblick auf die Medienkomposition bei der Massenproduktion von EPN aber eine interessante Fragestellung (vgl. Ehlers, 2001).

Das Fettdepot ist für die Dauerlarven die wichtigste Energiequelle und dient gleichzeitig als Nahrungsreserve. Es umfasst polare Lipide, neutrale Lipide und Sterine. Den größten Anteil nehmen die neutralen Lipide und unter diesen die Triglyceride ein, die bei *S. glaseri* etwa 80% des gesamten Lipidgehaltss ausmachen. Das Fettdepot macht etwa 34-60% des Trockengewichts einer Dauerlarve aus (Patel *et al.*, 1997; Hatab *et al.*, 1998). Neben den eingelagerten Lipiden kommt dem Glykogen eine gewisse Bedeutung als Energiereserve zu (Patel & Wright, 1997).

Der gemessene Triglyceridgehalt lag bei *S. glaseri* zwischen 50 und 80 ng pro Dauerlarve (Abb. 3.47). Patel *et al.* (1997) geben für die neutralen Lipide bei dieser Art 115 ng an. Geht man von 80% Triglyceriden unter den neutralen Lipiden aus, ergeben sich etwa 92 ng pro Dauerlarve. Die Differenzen mit den in dieser Arbeit gefundenen Werten könnten dreierlei Ursachen haben: (1) Es wurde eine andere Aufschlussmethode der Nematoden angewandt (Glashomogenisator im Vergleich zu Ultraschall; vgl. Abschnitt 2.2.8), (2) es wurde eine

empfindlichere Messmethode angewandt (Triglycerid GPO-Trinder-Kit im Vergleich zu Gaschromatographie), (3) es wurde ein anderer Stamm von *S. glaseri* verwendet.

4.5.12 Für *H. bacteriophora* ist der Umfang des Fettdepots weniger variabel

Weder für die Selektionslinie noch für den Ausgangsstamm von *H. bacteriophora* konnte eine wesentliche Änderung des Umfangs des Fettdepots in Abhängigkeit vom Vermehrungswirt der Nematoden (*M. melolontha*- im Vergleich zu *Galleria*-Larven) nachgewiesen werden (Abschnitt 3.5.2, Abb. 3.47). Dies deutet darauf hin, dass *H. bacteriophora* in Bezug auf den Fettstoffwechsel weniger spezifisch und in geringerem Ausmaß reagiert als *S. glaseri*.

Der gemessene Triglyceridgehalt für *H. bacteriophora* lag zwischen 10 und 15 ng pro Dauerlarve und liegt damit in einem Bereich, wie er auch von anderen Autoren angegeben wird. Jung (1999) verwendete die gleiche Messmethode wie in der vorliegenden Arbeit und gibt für zwei *H. bacteriophora*-Stämme einen Triglyceridgehalt von etwa 3-28 ng pro Dauerlarve an (Mittelwert etwa 11 ± 3 ng). Zwischen der Länge der Dauerlarven, deren Triglyceridgehalt und deren Leistung in einem *Tenebrio*-Biotest bestanden keine Korrelationen (Wijbenga & Rodgers, 1994; Jung, 1999).

Bei der Flüssigkultur stellten Han & Ehlers (2001) fest, dass sich *S. carpocapsae* ohne die Anreicherung des Mediums mit Lipiden nicht vermehren konnte, während *H. bacteriophora* sich auch ohne die Zugabe von Lipiden vermehrte. Die von *H. bacteriophora* eingelagerten, essentiellen Lipide werden in erster Linie von dessen symbiotischen Bakterium zur Verfügung gestellt (Ehlers, 2001). Dies erklärt die geringere Variabilität des Lipidgehalts und die geringere Abhängigkeit vom Vermehrungswirt bei dieser Art.

Lipide machen etwa 34-43% des Trockengewichts bei *Heterorhabditis* sp. aus, wobei 70-90% auf neutrale Lipide entfallen. Unter den Fettsäuren nimmt die Ölsäure den größten Anteil ein (51%), ihr folgen die Palmitinsäure (13%) und Linolsäure (12%) (Fitters *et al.*, 1999). Yoo *et al.* (2000) stellten fest, dass die höchsten Ausbeuten bei der Flüssigkultur von *H. bacteriophora* mit Medien erreicht wurden, die hauptsächlich mit einfach ungesättigten und relativ wenig gesättigten Fettsäuren angereichert waren.

4.5.13 Die Bedeutung der symbiotischen Bakterien

Die aus dem Ausgangsstamm und der Selektionslinie H1-10 isolierten symbiotischen Bakterien von *H. bacteriophora* hatten nach hämocoaler Injektion in *M. melolontha*-Larven eine gleich hohe Wirkung (Abschnitt 3.5.2, Abb. 3.46). Angesichts der auch in den LD₅₀-

Bestimmungen gefundenen sehr hohen Virulenz der symbiotischen Bakterien des Ausgangsstammes (HYB) ist zu erwarten, dass die Virulenz der Bakterien genetisch fixiert ist (vgl. Abschnitt 3.3.3, Tab. 3.5). Einen größeren Einfluss dürfte der physiologische Zustand der Bakterien ausüben, sowie die Menge der eingelagerten Bakterien pro Dauerlarve. Diese Parameter wiederum werden von den Vermehrungsbedingungen der Nematoden beeinflusst. Die Zahl der eingelagerten Bakterien pro Dauerlarve unterlag hohen Schwankungen, sie lag zwischen 150 und etwa 4000 Bakterien pro Dauerlarve (Daten nicht dargestellt). Es konnte keine Korrelation zwischen der Zahl der eingelagerten Bakterien und dem Vermehrungswirt der Nematoden festgestellt werden. Zwischen der Selektionslinie und dem Ausgangsstamm bestand kein Unterschied. Die Untersuchungen beschränkten sich allerdings auf das Auszählen der Bakterienzellen aus einer definierten Zahl homogenisierter Nematoden. Es lassen sich daher keine Aussagen über die Zahl lebender Bakterien (z.B. über die koloniebildenden Einheiten) noch über den physiologischen Zustand der Bakterien machen. Auch über den Anteil an Dauerlarven ohne eingelagerte Bakterien können keine Aussagen getroffen werden.

Die symbiotischen Bakterien von EPN zeigen das Phänomen der Pleomorphie, d.h. es sind zwei Formen („Phasen“) bekannt, die sich phänotypisch unterscheiden (Akhurst, 1980; Nealson *et al.*, 1990). Die primäre Form der Bakterien ist diejenige, die im Darmtrakt der Nematoden mitgeführt wird, während die sekundäre Form meist während langfristiger *in vitro* Kultur entsteht (Akhurst & Boemare, 1990; Han & Ehlers, 2001). Die primäre Form zeigt im Gegensatz zur sekundären Form eine ausgeprägtere Lumineszenz (Nealson *et al.*, 1990). In einer Charge der Selektionslinie H1-14 konnte kaum Lumineszenz nachgewiesen werden. Dies ist daher ein Hinweis darauf, dass die Dauerlarven relativ wenig Bakterien eingelagert hatten oder vorwiegend die sekundäre Form beherbergten (Ehlers, 2001; pers. Mitteilung). Ursache hierfür können schlechte Entwicklungsbedingungen für *H. bacteriophora* in *M. melolontha*-Larven sein. Eine Folge davon kann sein, dass sich die eingelagerten Bakterien in höherem Maß in die sekundäre Form umwandeln. Um diesbezüglich sichere Aussagen machen zu können, bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

Da die primäre im Vergleich zur sekundären Bakterienform mehr Antibiotika produziert, die helfen Fremdkeime im Insektenkadaver zu unterdrücken (Nealson *et al.*, 1990), kann der höhere Anteil Bakterien in der sekundären Form auch dazu führen, dass Fremdkeime in stärkerem Maß aufkommen und die Vermehrung und Entwicklung der Nematoden beeinträchtigen.

Es ist mehrfach dokumentiert, dass die primäre Form der symbiotischen Bakterien die Entwicklung der Nematoden besser fördert als die sekundäre Form, wobei es allerdings Unterschiede zwischen den Arten gibt (Akhurst, 1980, 1983; Akhurst & Boemare, 1990). Akhurst & Boemare (1990) berichten bei *in vitro* Kulturen von *Heterorhabditis* spp. von einer Erhöhung des Vermehrungspotentials um den Faktor 3, wenn die Nematoden mit der primären statt der sekundären Form der Bakterien (*P. luminescens*) kultiviert wurden. Dagegen konnte für *S. feltiae* und dessen Symbiont (*X. bovienii*) kein Unterschied beobachtet werden. Han & Ehlers (2001) konnten in Flüssigkultur von *H. bacteriophora* feststellen, dass die Nematoden sich nur fortpflanzten, wenn sie mit der primären Form der Bakterien kultiviert wurden.

Auch Ehlers *et al.* (1990) berichten, dass das Vermehrungspotential *in vitro* als auch *in vivo* erhöht wird, wenn die Nematoden mit der primären Form der Bakterien ausgestattet sind. Eine gleichzeitig höhere Infektiosität konnte dagegen lediglich für *H. heliothidis* beobachtet werden, während für die *Steinernema*-Arten (*S. carpocapsae*, *S. glaseri*) kein Unterschied festzustellen war. Dies ist ein weiterer Beleg dafür, dass die symbiotischen Bakterien für *Heterorhabditis*-Arten beim Infektionsprozess eine größere Bedeutung haben als für die meisten *Steinernema*-Arten.

Bei *S. glaseri* bestand ebenfalls kein Unterschied in der Virulenz der symbiotischen Bakterien des Ausgangstammes und der Selektionslinie S1-5 (Abb. 3.46). Für die Selektionslinie S1-10 bzw. S2-10 wurde der Versuch mangels Tiermaterials allerdings nicht wiederholt. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die symbiotischen Bakterien dieser Linien virulenter wurden. Für *S. glaseri* sind die nur schwach virulenten Bakterien ein Selektionslimit (vgl. Abb. 4.2). Durch die Reduzierung der Anzahl applizierter Nematoden auf bis zu 8 Dauerlarven pro *M. melolontha*-Larve, dürfte auch für die Bakterien ein ungewohnt hoher Selektionsdruck entstanden sein, der eine Selektion auf höhere Virulenz gefördert hat, zumal die Anzahl eingelagerter Bakterien pro Dauerlarve bei *S. glaseri* relativ klein ist (Selvan *et al.*, 1993c). Selvan *et al.* (1993c) konnten pro Dauerlarve lediglich 5 (Stamm NC) bzw. 20 (Stamm NJ-43) kolonieformende Einheiten (engl. *colony forming units*, CFU) nachweisen, außerdem konnten sie zeigen, dass ein großer Teil der Dauerlarven (55-77%) keine CFU enthielt.

Akhurst (1986) beobachtete, dass in kleineren Dauerlarven (< 1 mm) signifikant weniger Bakterien nachweisbar waren als in großen Dauerlarven (> 1,2 mm) der gleichen Kultur.

Die in vorliegender Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Ermittlung der Anzahl eingelagerter Bakterien pro Dauerlarve führten zu keinen aussagekräftigen Ergebnissen. Es

konnte aber beobachtet werden, dass die Dauerlarven von *S. glaseri* in den meisten Fällen neben den symbiotischen Bakterien Fremdbakterien enthielten.

4.5.14 Die realisierte Heritabilität für das Vermehrungspotential ist nahezu null

Für beide Nematodenarten wurde aufgrund der relativ hohen Schwankungen zwischen den Zyklen für das Vermehrungspotential eine realisierte Heritabilität von $< 0,10$ ermittelt, die sich nicht signifikant von null unterschied (Abb. 3.36 und 3.41). Die Datenstruktur legt nahe, dass das Vermehrungspotential im Wesentlichen von äußeren Faktoren bestimmt wird. Wichtige äußere Faktoren sind z.B. das Wachstum der symbiotischen Bakterien, der physiologische Zustand des Insekts und das Auftreten von (konkurrierenden) Fremdkeimen im Insektenkadaver. Im Diskussionsteil zur Vorinfektion der Engerlinge durch Rickettsien (Kapitel 4.2) sind einige Beispiele der Konkurrenz von EPN mit anderen Pathogenen genannt. Ein weiterer äußerer Faktor ist die Überlebensrate der penetrierten Dauerlarven im Insekt. Peters & Ehlers (1997) konnten bei Schnakenlarven (*Tipula oleracea*) zeigen, dass die Einkapselung von eingedrungenen Nematoden und damit deren Überlebensrate in erster Linie vom physiologischen Zustand der Schnakenlarve selbst abhängt, also, aus der Sicht des Nematoden, von einem exogenen Faktor bestimmt wird.

Auch Peters (1994) vermutet, dass die mangelhafte Vermehrungsfähigkeit des Nematoden *S. feltiae* in Schnakenlarven durch Selektion nicht steigerbar ist. Der Autor begründet damit auch den Befund, dass noch kein Stamm dieser Nematodenart mit hoher Infektiosität gegen Schnakenlarven gefunden wurde, obwohl deren gemeinsames Vorkommen im gleichen Habitat häufig sei.

Die niedrigen Heritabilitäten für das Vermehrungspotential entsprechen durchaus den Erwartungen. Merkmale, die ganz allgemein dem Fitnessbereich angehören (z.B. Fertilität), zeichnen sich in der Regel durch niedrige Werte für h^2 aus ($\approx 0,05-0,20$) (Schüler *et al.*, 2001). Nach dem Theorem von Fisher (engl. *Fisher's fundamental theorem*) ist die Zunahme der Fitness gleich der Zunahme der additiv-genetischen Varianz der Fitness (Falconer & Mackay, 1996). Ist die additiv-genetische Varianz durch natürliche Selektion erschöpft, beruht die genetische Varianz auf Dominanz und epistatischen Interaktionen (vgl. Kapitel 4.6).

Aus der Sicht der Evolution ist zu erwarten, dass das Vermehrungspotential eines EPN in einem Insektenkadaver, insbesondere wenn das Insekt eine natürliche oder sogar bevorzugte Beute des Nematoden ist (Spezifität), bereits durch natürliche Selektion optimiert ist, d.h. die additiv-genetische Varianz ist erschöpft. Der natürliche Selektionsdruck auf ein hohes

Vermehrungspotential dürfte für EPN besonders ausgeprägt sein, da unter natürlichen Bedingungen die Nematoden nur gelegentlich ein Insekt befallen können und dadurch Gelegenheit zur Vermehrung erhalten. Diese Gelegenheit sollte dann auch optimal genutzt werden und wird lediglich durch suboptimale Umweltbedingungen (siehe oben) begrenzt bzw. reduziert.

4.5.15 Aus ökologischer Sicht ist die Befallsstrategie beider Nematodenarten auf langfristiges Überleben der Art optimiert

Die hoch virulenten symbiotischen Bakterien sowie der Umstand, dass *H. bacteriophora* sich zunächst über selbstbefruchtungsfähige Hermaphroditen entwickelt, machen eine einzelne Dauerlarve zu einer überlebensfähigen Einheit; das erhöht die Überlebenschancen der Art (vgl. Griffin *et al.*, 2001). Die Mechanismen, die die Infektiosität einer Dauerlarvenpopulation regeln, tragen demnach dazu bei, die Dauerlarven auf möglichst viele potentielle Wirte zu verteilen. Durch die postulierte dichteabhängige Pheromonwirkung (vgl. Abschnitt 4.4.3, Abb. 4.2) könnte folglich effektiv verhindert werden, dass sich bei hoher Nematoden-Dichte sehr viele Dauerlarven auf einen Wirt stürzen. Dadurch könnte das Vermehrungspotential der Gesamtpopulation als auch jeder einzelnen Dauerlarve beträchtlich reduziert werden. Die oben besprochenen Mechanismen, vor allem die hohe Umweltvarianz, tragen wahrscheinlich gerade unter Freilandbedingungen verstärkt dazu bei, eine Selektion auf Wirtsspezifität und hohe Infektiosität unter den Dauerlarven zu verhindern. Damit wird auch verständlich, dass durch EPN verursachte „echte“ Epidemien in Insektenpopulationen relativ selten sind und nur durch das Zusammenkommen mehrerer Faktoren möglich sind (Peters, 1996; vgl. Kapitel 4.1).

Für die Art *S. glaseri* ist aufgrund der weniger virulenten symbiotischen Bakterien und der ausschließlich geschlechtlichen Vermehrung der Nematoden das Eindringen mehrerer Dauerlarven notwendig. Die Dauerlarven dieser Art reagieren daher als Anpassung darauf bei Anwesenheit eines Wirts eher nach dem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ und erhöhen dadurch die Wahrscheinlichkeit, dass ein potentieller Wirt zur erfolgreichen Vermehrung genutzt werden kann. Der höhere Anteil infektiöser Dauerlarven gewährleistet demnach, dass sowohl in einen einzelnen Wirt mehr Dauerlarven eindringen, als auch, dass eine Verteilung auf mehrere Wirte möglich ist. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit einer Inzucht reduziert, für deren negative Folgen die Art wegen ihrer rein geschlechtlichen Vermehrungsweise anfälliger ist.

4.5.16 Wie müsste ein Selektionsprogramm auf höhere Infektiosität aussehen?

Als Vorteil der Selektion über Wirtspassagen wurde erwähnt, dass auf mehrere Merkmale gleichzeitig selektiert wird. Hazel & Lush (1942) konnten zeigen, dass die gleichzeitige Selektion auf n unkorrelierte Merkmale die Selektion um den Faktor \sqrt{n} effizienter macht, als die nacheinanderfolgende Selektion auf jedes einzelne Merkmal. Dieses Konzept sollte daher, auch aus ökonomischen Gründen, beibehalten werden. Die Abschätzung der realisierten Heritabilität weist im Vergleich zu Abschätzungen der anderen Heritabilitäten die kleinste Varianz auf (Hill, 1971), darüber hinaus hat sie einen größeren praktischen Bezug.

Ein Hauptproblem bei der Versuchsgestaltung in der vorliegenden Arbeit war der Mangel an Tiermaterial (*M. melolontha*-Larven), der dazu führte, dass nur wenig Wiederholungen durchgeführt werden konnten. Alle Abschätzungen genetischer Parameter erfordern jedoch die Durchführung von möglichst vielen Wiederholungen und/oder die parallele Untersuchung von Kontrollpopulationen. Da sich die hohe Umweltvarianz trotz gleicher Versuchsbedingungen als ein entscheidender Faktor herausstellte, gilt es vor allem diese zu eliminieren. Das kann durch (1) parallele Untersuchung einer (besser mehrerer) nicht selektierten Kontrollpopulation und Differenzbildung der Populationsmittelwerte zwischen Selektions- und Kontrollpopulation, (2) divergente Selektion auf Merkmalerhöhung und –erniedrigung, wobei die Selektionserfolge als Differenz zwischen den partiellen Erfolgen der beiden Richtungen gemessen werden, und (3) mehrere, unabhängige Wiederholungen der Selektion erreicht werden (Hill, 1972; Schüler *et al.*, 2001).

Diese Datenerhebungen erfordern, dass zu jeder Zeit eine genügend hohe Zahl an Versuchstieren zur Verfügung steht. Grundlegende Untersuchungen könnten an einem leichter zugänglichen „Modellinsekt“ durchgeführt werden. Das Modellinsekt sollte keine zu hohe Anfälligkeit gegenüber EPN aufweisen und leicht im Labor zu züchten sein. In der vorliegenden Arbeit wurde für einige vergleichende Untersuchungen Larven des Mehlkäfers verwendet (*T. molitor*).

Bei *H. bacteriophora* (in weitaus geringerem Ausmaß bei *S. glaseri*) wurde postuliert, dass die zuerst penetrierenden Dauerlarven häufig absterben. Um diese Dauerlarven zu „fischen“, müssten die befallenen Insekten kurze Zeit nach Kontakt mit den Nematoden (abhängig von der Infektionsdynamik) seziiert, die penetrierten Dauerlarven isoliert und z.B. auf künstlichen Medien vermehrt werden. Eine derartige Strategie könnte zudem die Umweltvarianz, bedingt durch die unsichere Vermehrung *in vivo*, reduzieren. Diese Selektionsstrategie wäre allerdings einseitiger, da sie in erster Linie auf die Penetrationsaktivität abzielte und dadurch unter Umständen „hyperaktive“ Nematoden gezüchtet würden.

Insbesondere eine divergente Selektion könnte interessante Aspekte über die genetische Verankerung und die genetische Korrelation einiger Merkmale liefern. Bei divergenten Selektionen hat sich jedoch häufig gezeigt, dass die Selektionserfolge für die beiden Richtungen nicht gleich sind (vgl. Schüler *et al.*, 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für die Art *S. glaseri* der Versuch einer Negativ-Selektion („geringere Infektiosität“ gegenüber *M. melolontha*-Larven) unternommen, mangels Tiermaterials aber nicht weitergeführt (Daten nicht dargestellt). Hierbei wurden die Dauerlarven, die sich nicht im befallenen Engerling aufhielten, mit *Galleria*-Larven aus dem Bodensubstrat geködert und vermehrt. In den vier durchgeführten Zyklen konnte allerdings kein Selektionserfolg beobachtet werden. Diesbezügliche Versuche könnten ebenfalls mit einem Modellinsekt durchgeführt werden, das in diesem Fall eine hohe Anfälligkeit gegenüber EPN haben sollte. Zur zusätzlichen Abschätzung der Heritabilität könnten die Linien, welche aus den Selektionen resultieren, gekreuzt werden (vgl. Falconer & Mackay, 1996).

Um die Übertragbarkeit der Versuche in die Praxis zu gewährleisten, sollten die Versuchsbedingungen möglichst naturnah gestaltet werden. Dies würde bedeuten, dass die Selektion von einer möglichst großen Population mit großer genetischen Variabilität (Kreuzungen) ausgeht und die Selektionsintensität nicht zu hoch gewählt wird.

4.6 Vergleichende Untersuchungen an Inzuchtlinien

Die vergleichenden Untersuchungen an Inzuchtlinien von *H. bacteriophora* (PS7) dienten dazu, die genetische Variabilität und die Heritabilität im weiteren Sinn für einige Merkmale abzuschätzen (vgl. Abschnitt 2.6.3). Wie bei den Selektionsexperimenten auch, handelt es sich bei allen untersuchten Merkmalen um solche, die von mehreren Genloci determiniert werden. Einzelne Genorte in einer solchen polygenen Vererbung werden als *quantitative trait loci* (QTL) bezeichnet (Falconer & Mackay, 1996). Über die Art einzelner Genorte, deren Anzahl und Lokalisierung ist jedoch nichts bekannt. Auch über deren Zusammenwirken (Epistasie) und den Anteil einzelner Genorte an der Merkmalsdetermination (Pleiotropie) ist nichts bekannt.

In diesem Kapitel wird zunächst die Rechenmethode zur Ermittlung der Heritabilität diskutiert (4.6.1), bevor auf die Ergebnisse selbst eingegangen wird (4.6.2 bis 4.6.5). Ein Vergleich mit Untersuchungen an *C. elegans* (4.6.6) und den umweltbedingten Merkmalskorrelationen (4.6.7) leiten zu einem Ausblick über (4.6.8).

4.6.1 Zur Berechnung der Heritabilität bei Inzuchtlinien

In der vorliegenden Arbeit wurden mit 20 Inzuchtlinien eines *H. bacteriophora*-Stammes Biotests an *Tenebrio*-Larven durchgeführt. Für diese 20 Inzuchtlinien wurden zusätzlich die Daten zum Vermehrungspotential und der *recovery* in Flüssigkultur ausgewertet. Diese Daten wurden von Dr. Olaf Strauch (Arbeitsgruppe Dr. R.-U. Ehlers, Phytopathologisches Institut Kiel) zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse der Kieler Arbeitsgruppe zur Heritabilitätsbestimmung des Vermehrungspotentials und der *recovery* in Flüssigkultur an insgesamt 30 Inzuchtlinien sind in Johnigk *et al.* (2002) publiziert. In dieser Publikation sind weitaus größere Werte für die Heritabilität angegeben (Vermehrungspotential $h_w^2 = 0,90$; *recovery* $h_w^2 = 0,38$; vgl. Tab. 4.2) als in der vorliegenden Arbeit. Die Differenzen sind in erster Linie auf die Rechenmethode zurückzuführen. Aus diesem Grund werden zunächst die Rechenmethoden einander gegenübergestellt bzw. erläutert.

Unter der vereinfachenden Annahme, dass keine nicht-additiv genetischen Varianzen³ vorliegen, lässt sich nachweisen, dass sich bei vollständiger Inzucht (d.h. der

³ Der Begriff „Varianz“ (Symbol s^2 bzw. σ^2) wird hier im Sinne der Statistik verwendet und entspricht der Summe der Abweichungsquadrate aller Messwerte einer Verteilung von ihrem Mittelwert bei einem Merkmal (vgl. Köhler *et al.*, 1996). Die Abweichungen der Messwerte vom Mittelwert haben unterschiedliche Ursachen, wie z.B. umweltbedingte (= „Umweltvarianz“) und genetisch bedingte (= „genetische Varianz“). Die sich daraus ergebende Gesamtvarianz entspricht der phänomenologisch erfassbaren Bandbreite der Messwerte des Merkmals und wird auch als phänotypische Varianz oder als Variabilität des Merkmals bezeichnet (vgl. Kapitel 2.6).

Inzuchtkoeffizient $F = 1,0$) die genetische Varianz der Gesamtpopulation verdoppelt und als Varianz zwischen den Inzuchtlinien erscheint (Falconer & Mackay, 1996, S. 264ff). Diese Aufspaltung der Varianz ist Grundlage der Berechnung der Heritabilität im weiteren Sinn über vergleichende Untersuchungen an Inzuchtlinien.

Die Heritabilität im weiteren Sinn (engl. *heritability in the broad sense* oder *broad-sense heritability*) gibt das Ausmaß an, in welchem die einzelnen Phänotypen durch die verschiedenen Genotypen bestimmt werden. Daher wird die Heritabilität im weiteren Sinn im Englischen häufig auch als '*degree of genetic determination*' bezeichnet (Falconer & Mackay, 1996).

Die Abschätzung der Heritabilität im weiteren Sinn erfolgt meist über genetisch uniforme Populationen wie Inzuchtlinien oder der F1 aus zwei Inzuchtlinien, da innerhalb einer solchen Population die genetische Varianz nahezu null ist. Die Varianz innerhalb einer solchen Population liefert daher einen Schätzwert für die Umweltvarianz. Dabei wird jedoch vorausgesetzt bzw. angenommen, dass die Umweltvarianz für alle (anderen) Genotypen die gleiche ist, was aber nicht zutrifft. Diese grundlegende Annahme führt daher zu einem Schätzfehler, der ausgeglichen werden kann, indem die Schätzung mit mehreren Genotypen erfolgt. Die Schätzung der phänotypischen Varianz erfolgt an einer (mehreren) nicht ingezüchteten Population(en), z.B. der Ausgangspopulation für die Inzuchtlinien. Aus der Differenz der so geschätzten phänotypischen und umweltbedingten Varianz erhält man einen Schätzwert für die genetische Varianz der Ausgangspopulation (Falconer & Mackay, 1996, S. 122ff; Schüler, 2002, pers. Mitteilung). Die Heritabilität im weiteren Sinn wird dann als Quotient aus der genetischen und der phänotypischen Varianz berechnet.

In der vorliegenden Arbeit wurde die genetische Varianz der Ausgangspopulation geschätzt, indem die Umweltvarianz jeder Inzuchtlinie (die genetische Varianz innerhalb einer Inzuchtlinie ist nahezu null; vgl. Abschnitt 2.6.3) von der phänotypischen Varianz der Ausgangspopulation abgezogen wurde. Da diese Abschätzung mit jeder der 20 Inzuchtlinien durchgeführt wurde, war es möglich, die für jede Inzuchtlinie individuell wirkenden Genotyp-Umwelt-Interaktionen über alle Inzuchtlinien zu mitteln und den Wert der Heritabilität mit der Angabe eines Schätzfehlers sowie eines Vertrauensintervalls zu versehen.

Neben dieser Rechenmethode wird häufig eine weitere Methode angewandt. Bei dieser Methode wird der Wiederholbarkeitskoeffizient verwendet, der den Zusammenhang zweier aufeinander folgender Messungen eines Merkmals am selben Individuum bzw. der selben Gruppe (z.B. eine Inzuchtlinie) beschreibt (Falconer & Mackay, 1996; Hastings, 1994). Kann man davon ausgehen, dass die Varianz der einzelnen Messungen gleich ist, lässt sich der

Wiederholbarkeitskoeffizient auch über die Varianzkomponenten (vgl. Fußnote S. 187) definieren. Der Rechenweise einer einfaktoriellen ANOVA (engl. *analysis of variance*) entsprechend (z.B. Köhler *et al.*, 1996), gilt dann $r = \sigma_B^2 / (\sigma_B^2 + \sigma_W^2)$, wobei σ_B^2 die Varianz zwischen (*between*) und σ_W^2 die Varianz innerhalb (*within*) den Gruppen (Linien, Individuen) darstellt (als synonym von r wird auch ω^2 gebraucht). Eingedeutet aus der englischen Bezeichnung 'intraclass correlation coefficient of phenotypic values' wird der Koeffizient auch als 'Intraklasskorrelation' bezeichnet (Schüler *et al.*, 2001). Die genetische Interpretation der Varianzkomponenten führt dann zu folgender Gleichsetzung:

$$r = \frac{\sigma_g^2 + \sigma_{up}^2}{\sigma_g^2 + \sigma_{up}^2 + \sigma_{us}^2} \quad (4.3)$$

wobei σ_g^2 = genetische Varianz, σ_{up}^2 = permanente Umweltvarianz und σ_{us}^2 = spezielle Umweltvarianz ist. Der Nenner von Gl. (4.3) entspricht der phänotypischen Varianz. Die permanente Umweltvarianz bezeichnet die umweltbedingte Varianz zwischen den Gruppen (Linien, Individuen), während die spezielle Umweltvarianz die umweltbedingte Varianz innerhalb einer Gruppe (Linie, Individuum) bezeichnet. Die spezielle Umweltvarianz kennzeichnet z.B. die umweltbedingte Varianz, die zwischen verschiedenen Chargen (engl. *batches*) derselben Inzuchtlinie auftritt und kann durch die Anzahl der Wiederholungen reduziert werden; bei n Wiederholungen (= Anzahl Chargen) wird sie um den Faktor $1/n$ kleiner. Allerdings ist der Zuwachs an Genauigkeit nur bei kleinen Werten von r relevant (vgl. Falconer & Mackay, 1996, S. 139ff).

Wenn keine permanente Umweltvarianz vorkommt, ist die Wiederholbarkeit gleich der Heritabilität im weiteren Sinn. Geht man davon aus, dass die phänotypischen Unterschiede zwischen verschiedenen Inzuchtlinien ausschließlich genetisch bedingt sind und die permanente Umweltvarianz null ist, lässt sich auf diese Weise ein Schätzwert für die obere Grenze der Heritabilität im weiteren Sinn ermitteln. Da die permanente Umweltvarianz zwischen verschiedenen Inzuchtlinien aufgrund der bereits oben erwähnten Genotyp-Umwelt-Interaktionen nicht null ist, ergibt die Berechnung eine Überschätzung von h_w^2 . Diese Methode wurde z.B. von Glazer *et al.* (1991), Glazer *et al.* (1997) und Johnigk *et al.* (2002) angewandt.

Da die beiden Methoden in Abhängigkeit von der Datenstruktur sehr unterschiedliche Werte ergeben können, sind nachfolgend die mit beiden Rechenweisen erhaltenen Schätzwerte verschiedener Merkmale des Nematoden *H. bacteriophora* aus einigen Publikationen gegenübergestellt (Tab. 4.2). Die Differenzen beruhen in erster Linie darauf, dass mit der in der vorliegenden Arbeit angewandten Methode der Teil der Inzuchtlinien nicht berücksichtigt

wird, deren spezielle Umweltvarianz größer ist als die phänotypische Varianz der Ausgangspopulation. Bei der Intraklasskorrelation sind hingegen alle Inzuchtlinien, unabhängig von deren speziellen Umweltvarianz, berücksichtigt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Voraussetzungen einer ANOVA, nämlich homogene Varianzen der Faktorstufen und Normalverteilung der Daten, erfüllt sind (Köhler *et al.*, 1996; Schüler *et al.*, 2001; vgl. Tab. 4.2). Da die spezielle Umweltvarianz durch mehrfache Wiederholungen kleiner wird, wird auch der Effekt der unterschiedlichen Gewichtung der speziellen Umweltvarianzen kleiner, so dass sich die Schätzwerte für h_w^2 aus den beiden Methoden einander annähern, je größer die Zahl der untersuchten Chargen ist und je mehr Inzuchtlinien untersucht werden.

Die Abschätzung genetischer Parameter sollte auf möglichst großen Datensätzen beruhen (Schüler *et al.*, 2001). Die aus Tab. 4.2 ersichtlichen Differenzen zwischen den beiden Rechenmethoden sind demzufolge wahrscheinlich auch auf den unzureichenden Umfang der Datensätze zurückzuführen. In der vorliegenden Arbeit wurden 3-8 Chargen mit 1-2 Wiederholungen für jede der 20 Inzuchtlinien untersucht, in Johnigk *et al.* (2002) waren es vier Chargen mit jeweils zwei Wiederholungen pro Charge bei 30 Inzuchtlinien, in Glazer *et al.* (1991) und Glazer *et al.* (1997) waren es eine Charge mit 3-6 Wiederholungen pro Charge bei 13-25 Inzuchtlinien. Dies dürfte aus statistischer Sicht jeweils eine untere Grenze des Umfangs darstellen, mit dem solche Untersuchungen angestellt werden sollten. Mehrere Chargen sollten unbedingt untersucht werden, da die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und von Johnigk *et al.* (2002) zeigen, dass die Varianz zwischen verschiedenen Chargen im Vergleich zu der Varianz innerhalb einer Charge relativ groß ist (Strauch, 2002; pers. Mitteilung); dies dürfte jedoch auch vom zu untersuchenden Merkmal abhängen. Der Untersuchung von Ursachen der Umweltvarianzen zwischen verschiedenen Chargen, z.B. Lagerungszeit und -temperatur, die eine Grundlage für die Qualitätsbeurteilung darstellt, wurden bereits ganze Arbeiten gewidmet (z.B. Jung, 1999; Boff, 2001; vgl. Kapitel 4.3 und 4.4).

Aus Tab. 4.2 geht hervor, dass von den Merkmalen, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, lediglich für das Merkmal „Vermehrungspotential in Flüssigkultur“ die Voraussetzungen zur Berechnung mit der Intraklasskorrelation, nämlich Normalverteilung und homogene Varianzen der Daten, erfüllt sind. Für alle anderen Merkmale sind die so berechneten h_w^2 -Werte daher vorbehaltlich. Ein Vergleich der mit den beiden Methoden berechneten h_w^2 -Werte zeigt in den meisten Fällen die gleiche Tendenz der Größenordnung an, z.B. für die Infektiosität gegenüber *Tenebrio*-Larven und das *recovery* in Flüssigkultur

(Tab. 4.2). Ist bei den Werten, die wie in vorliegender Arbeit berechnet wurden, das 95%-Konfidenzintervall sehr groß (z.B. 0-0,84*; vgl. Tab. 4.2), ist daraus auf eine inhomogene (ungeeignete) Datenstruktur zu schließen und die angegebenen h_w^2 -Werte haben kaum Aussagekraft.

Die dargestellten Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit sind auf jeden Fall dazu geeignet, für die untersuchten Merkmale eine erste Abschätzung der Größenordnung für die Heritabilität im weiteren Sinn zu erhalten.

Tab. 4.2. Zusammenfassende Darstellung von Werten für die Heritabilität im weiteren Sinn (h_w^2) verschiedener Merkmale des Nematoden *H. bacteriophora* aus verschiedenen Publikationen. Die Ergebnisse basieren allesamt auf vergleichenden Untersuchungen an Inzuchtlinien. Angegeben sind die Werte für h_w^2 , berechnet nach der Methode in Glazer *et al.* (1991) und der in vorliegender Arbeit verwendeten Methode. Die Versuche in Glazer *et al.* (1991) und Glazer *et al.* (1997) wurden mit dem Ausgangsstamm HP88 durchgeführt, die übrigen mit dem Ausgangsstamm PS7. Bei den mit * gekennzeichneten Werten ist die Abschätzung aufgrund der Datenstruktur unsicher oder nicht möglich. n.m. = nicht möglich

Merkmal	h_w^2 berechnet wie in		Herkunft der Daten
	ANOVA	Vorliegender Arbeit ¹	
Hitzetoleranz	0,98	$0,36 \pm 0,16$ (0,29-0,44)	Glazer <i>et al.</i> (1991)
UV-Toleranz	0,66	$0,50 \pm 0,47$ (0,07-0,94)*	Glazer <i>et al.</i> (1991)
Wirtsfindung	0,50	$0,73 \pm 0,25$ (0,58-0,88)	Glazer <i>et al.</i> (1991)
Austrocknungstoleranz			
• mit Adaption	0,11	$0,81 \pm 0,32$ (0,62-1,00)	Glazer <i>et al.</i> (1991)
• ohne Adaption	0,07	$0,37 \pm 0,38$ (0,00-0,84)*	
Nematizidresistenzen			
• Fenamiphos	0,31	n.m.*	Glazer <i>et al.</i> (1997)
• Oxamyl	0,71	$0,40 \pm 0,26$ (0,24-0,57)	
• Avermectin	0,46	$0,64 \pm 0,29$ (0,47-0,82)	
Infektiosität bei <i>T.m.</i>	0,46 ⁴	$0,58 \pm 0,23$ (0,44-0,71) ³	vorliegende Arbeit
Penetrationsaktivität bei <i>T.m.</i>	0,30 ^{4,5}	$0,70 \pm 0,26$ (0,57-0,83) ³	vorliegende Arbeit
Vermehrungspotential in <i>T.m.</i>	0,46 ⁵	n.m.*	vorliegende Arbeit
Vermehrungspotential in Flüssigkultur	0,90 ² bzw. 0,32 ³	$0,30 \pm 0,23$ (0,11-0,50) ³	Johnnigk <i>et al.</i> (2002)
<i>recovery</i> in Flüssigkultur	0,38 ² bzw. 0,15 ^{3,4}	$0,20 \pm 0,19$ (0,04-0,36) ³	Johnnigk <i>et al.</i> (2002)

¹ Angegeben ist der Mittelwert sowie die Standardabweichung s und in Klammern das 95% Konfidenzintervall

² Berechnungen beziehen sich auf 30 Inzuchtlinien (Johnnigk *et al.*, 2002)

³ Berechnungen beziehen sich auf 20 der 30 Inzuchtlinien, die auch in Johnnigk *et al.* (2002) verwendet wurden

⁴ Daten nicht normalverteilt

⁵ Varianzen nicht homogen

Auch Shook & Johnson (1999) verwendeten die Intraklasskorrelation zur Berechnung der Heritabilität im weiteren Sinn aus vergleichenden Untersuchungen an 79 rekombinanten Inzuchtlinien von *C. elegans*. Für das Überleben („Lebensspanne“) auf Festmedium (Agarplatten) ermittelten sie z.B. einen Wert von 0,33.

Johnson & Wood (1982) berechneten über vergleichende Untersuchungen an rekombinanten Inzuchtlinien die Heritabilität im engeren Sinn (h_e^2 ; engl. *narrow-sense heritability*) der Lebensspanne von *C. elegans* (vgl. Abschnitt 4.6.6). Die Berechnung beruht ebenfalls auf der Intraklasskorrelation und der zusätzlichen Annahme, dass Dominanz- und Epistasie-Effekte bei den homozygoten Inzuchtlinien keine bzw. nur eine vernachlässigbare Rolle spielen. Da dies nur bedingt zutrifft, ist davon auszugehen, dass eine derartige Berechnung nur einen groben Schätzwert für h_e^2 liefert. Im homozygoten Zustand (z.B. A_1A_1) fließt die additiv-genetische Varianz mit dem Faktor 2 ein (Falconer & Mackay, 1996, S. 108ff; Schüler *et al.*, 2001, S. 74ff). Die Autoren berechneten die additiv-genetische Varianz daher mit folgender Modifikation der 'Wiederholbarkeit': $r = 0,5\sigma_B^2 / (0,5\sigma_B^2 + \sigma_W^2)$ (Johnson & Wood, 1982).

4.6.2 Die Werte für die Heritabilität der Infektiosität und der Penetrationsaktivität sind relativ hoch

Die Schätzwerte für die Heritabilität der Infektiosität und der Penetrationsaktivität gegenüber *Tenebrio*-Larven sind relativ groß (0,57 und 0,70; vgl. Tab. 3.12 und 3.13).

Das Merkmal Infektiosität beinhaltet auch die Penetrationsaktivität, da die Penetration Voraussetzung für eine Infektion ist. Für beide Merkmale spielt die Geschwindigkeit der Infektion eine Rolle, da die Auswertung stets nach sieben Tagen erfolgte. Die Geschwindigkeit der Infektion ist ein Maß für die Aktivität der Nematoden. Die Erfahrung zeigte, dass lediglich bei den gut wirkenden Chargen auch noch nach sieben Tagen ein leichter Anstieg der Mortalitätsanstieg bei den *Tenebrio*-Larven zu verzeichnen war. Der Schätzwert hätte sich demzufolge geringfügig geändert, wenn die Auswertung einige Tage später erfolgt wäre.

Die meisten Inzuchtlinien bewirkten eine Mortalität zwischen 40 und 60% (Tab. 3.12). Eine größere Bandbreite und eventuell eine etwas höhere Empfindlichkeit könnte durch Reduzierung der Zahl applizierter Nematoden erreicht werden (auf 10 oder 15 DL pro *Tenebrio*-Larve). Um zu vermeiden, dass die Bandbreite der Zahl penetrierter Nematoden sich verkleinert und deren Ermittlung erschwert wird, könnte die Penetrationsaktivität jeweils mit einer etwas höheren Dosis bestimmt werden als die Mortalität.

Da der Merkmalskomplex „Infektiosität“ auch die Penetrationsaktivität umfasst, ist der höhere h_w^2 -Wert der Penetrationsaktivität ein Hinweis darauf, dass dieses Merkmal der bedeutendste genetisch determinierte Faktor des Merkmals „Infektiosität“ darstellt.

Die Heritabilität im weiteren Sinn ist ein Maß für den Anteil der gesamten genetischen Varianz an der phänotypischen Varianz. Die gesamte genetische Varianz setzt sich aus der

additiv-genetischen Varianz, der Dominanzvarianz und der durch genetische Interaktionen bedingten Varianz zusammen (Falconer & Mackay, 1996; vgl. Abschnitt 2.6.3). Nur die additiv-genetische Varianz ist für die Zuchtwertschätzung bei Selektionsprogrammen maßgebend. Über die Größe der einzelnen Varianzkomponenten können keine Aussagen gemacht werden. Die ermittelten h_w^2 -Werte bedürfen demnach einer sorgfältigen Interpretation.

Die relativ hohen Werte für die Heritabilität der Infektiosität und der Penetrationsaktivität bedeuten, dass diese Merkmale offenbar keinem höheren natürlichen Selektionsdruck unterliegen. Aus der Sicht des Nematoden (genauer: der Art *H. bacteriophora*) hieße das, dass diese Merkmale unter natürlichen Bedingungen nicht unbedingt zur Fitness der Art beitragen. Läge ein hoher Selektionsdruck vor, wäre von einem wesentlich kleinerem h_w^2 -Wert auszugehen, da durch die natürliche Selektion die additiv-genetische Varianz bereits weitgehend erschöpft wäre. Jede Abschätzung der Heritabilität bezieht sich jedoch ausdrücklich auf die Bedingungen des jeweiligen Testsystems und ist nicht ohne weiteres auf andere Bedingungen (Umweltfaktoren) übertragbar (Falconer, 1952).

In den Selektionsversuchen zur Steigerung der Infektiosität gegenüber *M. melolontha*-Larven wurde eine realisierte Heritabilität von nahezu null ermittelt (Abschnitt 3.5.1). Die erweiterten Testbedingungen, die geringere Zahl an Versuchswiederholungen, die geringe Anfälligkeit der *M. melolontha*-Larven und die unsichere Vermehrung in *M.m.*-Larven hatten dort eine größere Umweltvarianz zur Folge. Houle (1992) konnte zeigen, dass niedrige Heritabilitäten nicht unbedingt auf geringe additiv-genetische Varianzen zurückzuführen sind, sondern häufig auf hohen nicht additiv-genetischen Varianzen (Dominanzvarianz, Interaktionen) und Umweltvarianzen beruhen. Demnach sind die relativ hohen h_w^2 -Werte bei den Inzuchtlinien die Folge einer Reduzierung der Umweltvarianz und deuten an, dass für diese Merkmale tatsächlich ein vergleichsweise großes Potential an additiv-genetischer Varianz vorhanden ist. Außerdem können die stringenten Testbedingungen aufgrund von Genotyp-Umwelt-Interaktionen Linien gefördert haben, die mit genau diesen Bedingungen am besten zurecht kamen.

Ob eine Steigerung der Infektiosität und der Penetrationsaktivität von *H. bacteriophora* gegenüber *Tenebrio*-Larven möglich wäre, also der Anteil der additiv-genetischen Varianz tatsächlich groß ist, ließe sich durch Selektionsversuche unter den gleichen Testbedingungen überprüfen.

4.6.3 Das Vermehrungspotential im Insekt (*in vivo*) hatte die höchste Umweltvarianz

Das Vermehrungspotential *in vivo* (*Tenebrio*-Larven) hatte von allen untersuchten Merkmalen die höchste Umweltvarianz. Bei fast allen Inzuchtlinien war die Umweltvarianz größer als die phänotypische Varianz des Ausgangsstammes (Abschnitt 3.6.1, Tab. 3.14). Aufgrund dieser Datenstruktur war es nicht möglich, einen vernünftigen Wert für die Heritabilität abzuschätzen. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen der Selektionsversuche überein. Die hohe Umweltvarianz des Vermehrungspotentials wird bei den Inzuchtlinien wahrscheinlich noch verstärkt und weist auf eine niedrige Heritabilität hin (vgl. Abschnitt 4.5.14).

4.6.4 Vermehrungspotential und *recovery* in Flüssigkultur (*in vitro*)

Im Gegensatz zum Vermehrungspotential *in vivo* wurde für das Vermehrungspotential *in vitro* (Flüssigkultur) mit 0,3 ein relativ hoher Wert für die Heritabilität im weiteren Sinn ermittelt (Abschnitt 3.6.1, Tab. 3.15). Wie bereits erwähnt, haben Merkmale aus dem Fitness-Bereich, wie z.B. die Fertilität, häufig eine sehr kleine Heritabilität (Schüler *et al.*, 2001; vgl. Abschnitt 4.5.14). Der Heritabilitätswert des Vermehrungspotentials lässt daher darauf schließen, dass die Bedingungen der Flüssigkultur von den Nematoden weitere Merkmale, die stärker genetisch determiniert sind, erfordern. Um welche Merkmale bzw. Merkmalskomplexe es sich dabei handelt, bleibt offen. Merkmale, die dem Fitness-Bereich zugeordnet sind, werden im englischen Sprachgebrauch häufig als *life-history traits* (LHTs) bezeichnet (Falconer & Mackay, 1996). Für derartige Merkmale werden gemeinhin größere epistatische und pleiotrope Effekte postuliert als z.B. für morphologische Merkmale (Roff & Mousseau, 1987; Knight *et al.*, 2001). Bei *C. elegans* wurde nachgewiesen, dass längerlebige Linien eine geringere Fertilität aufweisen (Knight *et al.*, 2001). Dass eine geringe Heritabilität nicht unbedingt mit geringer additiv-genetischer Varianz einhergehen muss, wurde bereits weiter oben erläutert (Abschnitt 4.6.2).

Die Vorauswahl der entstehenden Inzuchtlinien während einer Flüssigkultur wird durch das *recovery* getroffen, welches den Übergang vom stoffwechsel- und entwicklungsinaktiven Dauerlarven-Stadium zum nächsten Larvenstadium kennzeichnet. Für das *recovery* wurde eine Heritabilität im weiteren Sinn von etwa 0,2 ermittelt (Abschnitt 3.6.1, Tab. 3.16). Das *recovery* wird in erster Linie durch ein oder mehrere Signale ausgelöst, die z.B. von der Hämolymphe eines Insekts und von den symbiotischen Bakterien ausgehen. In Flüssigkultur müssen daher die symbiotischen Bakterien vorkultiviert werden, um eine höhere Konzentration des „*food signal*“ und damit der *recovery* zu erreichen (Ehlers, 2001; Johnigk *et al.*, 2002). Ein weiteres Indiz für die hohe Umweltvarianz des *recovery* ist die

Beobachtung, dass Dauerlarven, die vor der Kultur bei 6°C gelagert wurden, eine signifikant erhöhte *recovery* aufwiesen (Johnigk *et al.*, 2002). Demnach wäre zu erwarten, dass das vor allem durch Umweltreize ausgelöste *recovery* eine geringe Heritabilität aufweist. Der mit 0,2 ermittelte Wert für die Heritabilität erscheint in Anbetracht dessen relativ groß, legt aber erneut nahe, dass weitere Merkmale (= weitere Genloci), die eine Anpassung an die Flüssigkultur mit sich bringen, in diesen Wert einfließen.

4.6.5 Mögliche Folgen der Vermehrung in Flüssigkultur

Wenn tatsächlich weitere Merkmale zu einem hohen Vermehrungspotential in Flüssigkultur beisteuern, wäre daraus abzuleiten, dass die längerfristige Vermehrung in Flüssigkultur eine Selektion der Nematoden mit sich bringt, die den Bedingungen der Flüssigkultur besonders genügen. Der Umkehrschluss, dass durch Selektion das Vermehrungspotential in Flüssigkultur gesteigert werden kann, ist natürlich ebenso berechtigt. Die Verhinderung der Kopulation unter den Bedingungen der Flüssigkultur (vgl. Abschnitt 1.2.2) bedingt automatisch die Entstehung mehrerer paralleler Inzuchtlinien (Johnigk *et al.*, 2002); dies kommt für jede neu angesetzte Kultur einer anfänglichen Selektion gleich (Strauch, 2002; pers. Mitteilung).

Die h_w^2 -Werte sowohl des Vermehrungspotentials als auch der *recovery* in Flüssigkultur legen nahe, dass bei Selektionen zur Verbesserung dieser Merkmale Genotyp-Umwelt-Interaktionen (engl. *genotype-environment-interactions*, GEIs) eine große Rolle spielen. Ergebnisse aus vergleichbaren Untersuchungen an *C. elegans* bestätigen diese Vermutung (Shook & Johnson, 1999; vgl. Abschnitt 4.6.6). Die Selektion könnte daher zu Linien führen, deren „Fitness-Merkmale“ nur unter den Bedingungen der Flüssigkultur „besser“ sind, während sie unter anderen Bedingungen zur Unterlegenheit dieser Linien führen. Durch pleiotrope Effekte könnten weitere Merkmale verändert werden. Derartige Selektionsprogramme müssen daher breit angelegt sein und weitere Merkmale der Nematoden berücksichtigen, damit unerwünschte Selektionseffekte frühzeitig erkannt bzw. vermieden werden (vgl. Abschnitt 4.5.16 und 4.6.7). Anzustreben wäre eine gleichzeitige (kombinierte) Selektion auf mehrere Merkmale und/oder die gezielte Kreuzung von selektierten Linien (vgl. Falconer & Mackay, 1996).

In der Praxis der Produktion von Nematoden in Flüssigkultur wird stets von einer „frischen“ Stammpopulation ausgegangen (Peters, 2001; pers. Mitteilung). Dieses Vorgehen ist aufgrund der vorangegangenen Überlegungen zu befürworten. Aus wissenschaftlichen Gründen wäre

die Etablierung einer Linie durch ausschließliche Vermehrung in Flüssigkultur jedoch außerordentlich interessant (vgl. Abschnitt 4.7.6).

4.6.6 Vergleichbare Untersuchungen an *C. elegans*

Vergleichbare Studien mit Inzuchtlinien an EPN wurden bisher relativ selten durchgeführt und beziehen sich auf andere Merkmale, wie z.B. Hitzetoleranz, UV-Resistenz und Wirtsfindung (Glazer *et al.*, 1991) oder auf Resistenz gegenüber Nematiziden (Glazer *et al.*, 1997; vgl. Tab. 4.2). Direkte Vergleiche sind deshalb nur bedingt möglich.

Für den nahe verwandten *C. elegans* gibt es vergleichbare Studien, die sich auf Merkmale des Fitness-Bereichs beziehen. Shook *et al.* (1996) und Shook & Johnson (1999) untersuchten Genotyp-Umwelt-Interaktionen sowie epistatische und pleiotrope Effekte von QTL (engl. *quantitative trait loci*; vgl. S. 187), die das Überleben und die Fertilität von *C. elegans* auf Festmedien und in Flüssigmedien beeinflussen. Dabei wurden vier QTL nachgewiesen, die das Überleben in den beiden Umwelten beeinflussten. Zwei dieser QTL hatten signifikante Genotyp-Umwelt-Interaktionen, d.h. diese QTL beeinflussen das Überleben in den verschiedenen Umwelten unterschiedlich.

Johnson & Wood (1982) ermittelten für h_w^2 der Lebensspanne (Alter) bei *C. elegans* eine Größenordnung von 0,34-0,44. Die Abschätzung der Heritabilität im engeren Sinn (h_e^2) ergab die gleiche Größenordnung der Werte (0,19-0,51). Diesen Befund sowie das Ausbleiben einer Heterosis der Lebensspanne nach der Kreuzung von Wildstämmen führen die Autoren auf den hohen natürlichen Inzuchtgrad bei *C. elegans* zurück, der durch die Etablierung von Inzuchtlinien im Labor nur noch unwesentlich erhöht werden kann. Die Autoren gehen daher davon aus, dass durch Zuchtmaßnahmen die Lebensspanne erhöht werden kann; einige rekombinante Inzuchtlinien hatten eine Lebensspanne die im Vergleich zum Wildstamm um über 70% erhöht war (31 im Vergleich zu 18 Tagen). Es ist aufgrund fehlender Inzuchtdepression bei *C. elegans* (vgl. Johnson & Wood, 1982; Ayyadevara *et al.*, 2001) naheliegend, dass die bereits weiter oben erwähnte geringere Fertilität längerlebiger Linien auf Pleiotropie und/oder Epistasie beruht. Ayyadevara *et al.* (2001) konnten für QTL, die die Lebensspanne von *C. elegans* beeinflussen (es werden mindestens 10 solcher QTL postuliert) epistatische Effekte nachweisen. Ähnliche Verhältnisse dürften auch bei *Heterorhabditis* zu erwarten sein.

Gemeinhin werden für Genloci von LHTs starke pleiotrope Effekte angenommen, obgleich dies selten direkt untersucht wurde (Knight *et al.*, 2001). Pleiotrope Effekte werden z.B. für die Merkmale Körpergröße und Fertilität angenommen. Bei *C. elegans* konnte jedoch

zwischen zwei die Körpergröße und drei die Fertilität beeinflussenden QTL (unter den Testbedingungen) keine pleiotropen Effekte nachgewiesen werden (Knight *et al.*, 2001). Pleiotrope Effekte konnten bei *C. elegans* zwischen den Merkmalen „Gesamtfertilität“, „Alter der ersten Reproduktion“ (= „Geschlechtsreife“) und „Wachstumsrate der Population“ dagegen nachgewiesen werden (Shook & Johnson, 1999). Die Annahme pleiotroper Effekte bei LHTs bezieht sich häufig auf bereits nachgewiesene genetische Korrelationen zwischen Merkmalen. Dabei wird jedoch nicht berücksichtigt, dass die Ursache der genetischen Korrelation auch ein Kopplungsungleichgewicht (engl. *linkage disequilibrium*) sein kann (Knight *et al.*, 2001).

4.6.7 Umweltbedingte Merkmalskorrelationen

Die umweltbedingte Korrelation zwischen zwei Merkmalen gibt an, wie sich die Merkmale unter verschiedenen Umweltbedingungen zueinander verhalten. Die meisten Werte für den Korrelationskoeffizienten r_u bei den untersuchten Merkmalen lagen im Bereich von $-0,3$ - $0,2$ (Abb. 3.50). Diese Größenordnung der Werte ist für r_u durchaus „normal“ (vgl. Schüler *et al.*, 2001). Im Einzelnen hängen die Werte natürlich stark von den untersuchten Organismen und den jeweiligen Merkmalen ab.

Eine relativ große negative Korrelation von $-0,3$ wiesen die Merkmale „Penetrationsaktivität“ und „Vermehrungspotential in Flüssigkultur“ auf. Aus dieser negativen Korrelation ist ableitbar, dass sich Inzuchtlinien, die eine hohe Penetrationsaktivität aufweisen, unter den Bedingungen der Flüssigkultur schlechter vermehren. Die Ursachen für diesen Zusammenhang bleiben unklar, könnten aber mit dem mechanischen Rühren während der Flüssigkultur zu tun haben, welches das Überleben und die Vermehrung von (bewegungs-) aktiveren Linien erschwert. Die Korrelation zwischen Penetrationsaktivität und Wanderaktivität wurde bereits besprochen (vgl. Abschnitt 4.4.1).

Die relativ kleine positive Korrelation zwischen den Vermehrungspotentialen *in vitro* und *in vivo* ($0,09$) besagt, dass ein hohes Vermehrungspotential in einem Insektenkadaver nur bedingt auf ein hohes Vermehrungspotential in Flüssigkultur schließen lässt. Dieses Ergebnis legt erneut nahe, dass bei der Vermehrung in Flüssigkultur neben der eigentlichen Fertilität noch weitere Faktoren zu einem hohen Vermehrungspotential beitragen. Bei *C. elegans* konnte dagegen eine gleich bleibend hohe Korrelation zwischen Fertilitätsmerkmalen in verschiedenen Umwelten nachgewiesen werden (Shook & Johnson 1999; vgl. Ende dieses Abschnitts).

Für die Penetrationsaktivität und die Infektiosität erscheint die umweltbedingte Korrelation mit 0,19 relativ klein, da die Penetrationsaktivität einen Teilaspekt der Infektiosität darstellt (vgl. Abschnitt 4.6.2). Dass kein größerer Wert ermittelt wurde, lässt sich dadurch erklären, dass bereits eine penetrierte Dauerlarve den Tod einer *Tenebrio*-Larve verursacht, d.h. weitere penetrierte Dauerlarven tragen nicht mehr zur Erhöhung der Infektiosität bei, wohl aber zur Erhöhung der Penetrationsaktivität. Bei einem weniger anfälligen Testinsekt, bei dem mehrerer Dauerlarven eindringen müssen, um das Insekt zu töten, wäre eine wesentlich höhere positive Korrelation zu erwarten. Der gleiche Effekt könnte durch eine empfindlichere Gestaltung des Tests erreicht werden, z.B. durch geringere Dosierungen (vgl. Abschnitt 4.6.2). Peters (1994) fand eine hohe Korrelation der Anzahl penetrierter Dauerlarven und der Infektiosität von *S. feltiae* bei Schnakenlarven (Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman, $r \approx 0,75$). Ähnliches berichtet Jung (1999) von *H. megidis* bei *Galleria*-Larven ($r \approx 0,62$).

Die negative umweltbedingte Korrelation des *recovery* und des Vermehrungspotentials in Flüssigkultur von -0,16 überrascht, da das *recovery* als entscheidender und die Gesamtausbeute limitierender Parameter bei der Massenvermehrung in Flüssigkultur angesehen wird (Ehlers, 2001). Die Populationsdynamik der Nematoden in Flüssigkultur ist ein komplexes Geschehen, das neben abiotischen Faktoren, wie z.B. der Medienkomposition und dem O₂-Gehalt, in erster Linie von der Dichte der Nematoden in den einzelnen Entwicklungsstadien dirigiert wird. Eine niedrige *recovery*-Rate ergibt wenig Hermaphroditen. Eine geringe Dichte an Hermaphroditen führt dazu, dass diese viele Eier legen, die sich dann aber nicht (wie gewünscht) zu Dauerlarven entwickeln, sondern zu bisexuellen Adulten (engl. *amphimictic adults*), die sich in Flüssigkultur nicht vermehren können, da die Kopulation nicht gelingt (vgl. Abschnitt 1.2.2). Die geringere Dichte der Hermaphroditen führt jedoch zu größeren Tieren, die mehr Eier legen können, so dass trotz verminderter Qualität der geernteten Dauerlarven noch Ausbeuten von mehr als 150000 DL/ml erreicht werden können (Ehlers, 2001). Die geringe negative umweltbedingte Korrelation des *recovery* und des Vermehrungspotentials erscheint in diesem Kontext als durchaus plausibel. Johnigk *et al.* (2002) stellten fest, dass sich die Korrelation zwischen dem *recovery* und dem Vermehrungspotential (gemessen anhand der Mittelwerte und nicht anhand der Standardabweichung *s* wie in vorliegender Arbeit) von 0,69 auf -0,01 verringerte, wenn die Nematoden zuvor bei 6°C gelagert wurden. Die Korrelation aller Datenpaare ergab einen Wert von 0,11. Die Differenzen der Werte für die umweltbedingten Korrelationen zwischen der vorliegenden Arbeit und Johnigk *et al.* (2002) haben folgende Ursachen: (1) Es wurden nur Daten von 20 der 30 in Johnigk *et al.* (2002) untersuchten Inzuchtlinien ausgewertet, (2)

es wurden die Standardabweichungen und nicht die Mittelwerte für die Korrelation verwendet. Die Begründung für die in vorliegender Arbeit angewandte Methode findet sich im Material- und Methodenteil (Abschnitt 2.6.4). Sie bezieht sich auf die Zerlegung der phänotypischen Korrelation in einen genetisch bedingten und einen umweltbedingten Anteil. Beide Methoden lassen jedoch die gleichen Tendenzen erkennen.

Auch Yoo *et al.* (2000) fanden eine negative Korrelation zwischen der Gesamtausbeute (= Vermehrungspotential in DL/g) und dem *recovery* bei der Flüssigkultur von *H. bacteriophora*. Eine weitgehende Unabhängigkeit zwischen dem *recovery* und der Endausbeute bei drei verschiedenen Temperaturen fanden Ehlers *et al.* (2000) bei der Art *H. indica*.

Demnach wird eine geringe *recovery* tatsächlich durch ein um so höheres Vermehrungspotential der verbleibenden Hermaphroditen kompensiert oder sogar überkompensiert.

Shook & Johnson (1999) geben eine Reihe von phänotypischen Korrelationen (diese entsprechen in der Publikation den umweltbedingten Korrelationen; die Versuche wurden mit rekombinanten Inzuchtlinien durchgeführt) verschiedener LHTs bei *C. elegans* an. Es wurden Merkmale wie das Überleben, das Alter der Geschlechtsreife, die Wachstumsrate der Population, die Fertilität und die Anfälligkeit für Austrocknung in Flüssig- und Festmedium verglichen. Die „Überlebensmerkmale“ (differenziert nach Todesursachen) in den verschiedenen Umwelten waren kaum korreliert, während alle Fertilitätsmerkmale (differenziert nach früher und später Fertilität und Wachstumsrate der Population) eine hohe Korrelation aufwiesen ($r \geq 0,65$).

4.6.8 Ausblick

Die derzeitigen Kenntnisse über die quantitative Genetik diverser Merkmale bei EPN sind gering. Es wurden daher mehrfach Vergleiche mit ähnlichen Studien an *C. elegans* angestellt. Das Genom dieser Art ist vollständig sequenziert und es liegen umfangreiche Genkartierungen und Untersuchungen zur quantitativen Genetik bestimmter Merkmale vor (z.B. Fodor, 2001).

Hastings (1994) empfiehlt, die Abschätzung der Heritabilität im weiteren Sinn über Inzuchtlinien als erste und relativ einfach durchführbare Methode bei EPN anzuwenden und weitere Untersuchungen von der Größe des Schätzwerts abhängig zu machen. Nur bei hohen Schätzwerten ist davon auszugehen, auch eine höhere Heritabilität im engeren Sinn als Maß für die Zuchtwertschätzung von Populationen und damit für die Erfolgsaussichten bei

Selektionen zu finden. Dass dies jedoch nicht zwingend der Fall sein muss, wurde in Abschnitt 4.6.2 erläutert.

Die Abschätzung der Heritabilität einzelner Merkmale sollte unbedingt durch weitere Methoden ergänzt und abgesichert werden. Die vorliegende und andere Arbeiten zeigen, dass bei entomopathogenen Nematoden mit Inzuchtlinien alleine zu arbeiten aufgrund der enorm großen Umweltvarianzen vielleicht problematischer als bei anderen Organismen ist (vgl. Abschnitt 2.6.3). Untersuchungen an der F1 aus zwei Inzuchtlinien wären daher sinnvolle Ergänzungen. So könnten Kreuzungen bestimmter, hinsichtlich der Ausprägung des zu untersuchenden Merkmals möglichst weit auseinanderliegender Inzuchtlinien etabliert werden. Die F1 könnte zur Abschätzung der Heritabilität im engeren Sinn über eine Eltern-Nachkommen-Regression verwendet werden. Die F2 sollte dann zur Etablierung von rekombinanten Inzuchtlinien verwendet werden, für die eine Abschätzung der Heritabilität im weiteren Sinn mit den in vorliegender Arbeit beschriebenen Methoden möglich wäre (vgl. z.B. Shook & Johnson, 1999).

Zur Abschätzung der Genotyp-Umwelt-Interaktionen und der Umweltvarianz sollten, sofern dies möglich ist, die Versuche in verschiedenen Umwelten (= Testsystemen) durchgeführt und verglichen werden (siehe z.B. Ricci *et al.*, 1996 und Peters, 2000b).

Bei der Gestaltung der Testsysteme und der Durchführung entsprechender Testserien ist, je nach zu untersuchendem Merkmal, darauf zu achten, dass den Nematoden eine Gewöhnungsphase (Adaption) zugestanden wird. Diese Adaption vermindert umweltbedingte „Schockeffekte“ und damit gleichzeitig die Umweltvarianz. Sie ist besonders wichtig, wenn die Toleranz gegenüber extremen Umweltbedingungen, wie z.B. „Hitze“ oder „Trockenheit“ untersucht wird (Glazer *et al.*, 1991; Glazer & Segal, 2001; Strauch, 2002; pers. Mitteilung; vgl. Tab. 4.2).

Kenntnisse über die genetische Korrelation von zwei Merkmalen sind besonders wertvoll, da sie Aussagen darüber zulassen, wie sich ein bestimmtes Merkmal ändert, wenn auf ein anderes selektiert wird. Die Inzuchtlinien erlauben die Abschätzung der umweltbedingten Korrelation zweier Merkmale. Die phänotypische Korrelation ließe sich z.B. über die F1 oder die F2 verschiedener Kreuzungen abschätzen. Ist die umweltbedingte und die phänotypische Korrelation bekannt, lässt sich auch eine Abschätzung der genetischen Korrelation vornehmen (vgl. z.B. Curtsinger, 1986).

4.7 Molekularbiologische Untersuchungen

In naher Zukunft ist zu erwarten, dass zahlreiche weitere Stämme entomopathogener Nematoden isoliert werden und die klassische Züchtung zur Verbesserung bestimmter Eigenschaften in größerem Ausmaß angewandt wird (Gaugler & Hashmi, 1998; Segal & Glazer, 1998; Burnell, 2001). Die molekularbiologischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit sollten Aufschluss darüber geben, ob die ISSR-PCR eine geeignete Methode zur eindeutigen genetischen Charakterisierung von Stämmen ist und genetische Veränderungen während der Züchtung im Labor oder nach einer Freilandapplikation nachweisbar sind.

Die Auftrennung der ISSR-PCR-Produkte erfolgte über eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese und anschließender Silberfärbung der Gele. Als weitere Methode wurde die RAPD-PCR mit Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Ethidiumbromidfärbung durchgeführt. Bei dem Vergleich der beiden Methoden sollte also stets bedacht werden, dass bei der ISSR-PCR eine empfindlichere Nachweismethode für die DNA angewandt wurde (vgl. z.B. Martin, 1996). Godwin *et al.* (1997) konnten zeigen, dass der größere Polymorphismus bei der ISSR-PCR-Methode nicht auf erhöhtem genetischen Polymorphismus beruht, sondern auf die empfindlichere Nachweismethode der DNA-Fragmente zurückzuführen ist.

Die RAPD-PCR gilt aufgrund häufiger Probleme bei der Reproduzierbarkeit als umstritten (vgl. z.B. Jones *et al.*, 1997). Die Methode wurde trotzdem angewandt, um an publizierte Studien anknüpfen und Vergleiche mit der ISSR-PCR anstellen zu können. Die Methode der ISSR-PCR wurde in vorliegender Arbeit erstmals in größerem Umfang bei entomopathogenen Nematoden angewandt. Lediglich in der britischen Arbeitsgruppe von A. Reid (CABI Bioscience, UK Center, Egham, Surrey) wurden bisher einige ISSR-Primer zur Unterscheidung von *Steinernema*-Isolaten getestet, wobei zur Auftrennung der PCR-Produkte ausschließlich Agarose-Gele eingesetzt wurden (Reid, 2001; pers. Mitteilung).

4.7.1 Vergleich der genetischen Distanzen und Erstellung von Dendrogrammen

Die RAPD- und die ISSR-PCR-Methode wiesen in Bezug auf die nach Nei & Li (1979) berechneten p -Distanzen⁴ eine hohe Übereinstimmung auf (Tab. 3.21). Der durchschnittliche Wert der Distanzen zwischen den sieben untersuchten Arten (*H.b.*, *H.m.*, *H.mar.*, *S.g.*, *S.a.*, *S.f.* und *C.e.*) war mit 76% bei der RAPD-PCR-Methode etwas kleiner als bei der ISSR-PCR-

⁴ Im folgenden Text wird statt „ p -Distanzen“ (gemeint sind die sichtbaren genetischen Distanzen; vgl. Abschnitt 2.8.14) von „Distanzen“ gesprochen. Die genetische Distanz zwischen zwei Stämmen ist ein Maß für deren Verwandtschaftsgrad: je kleiner die Distanz, desto näher sind die Stämme miteinander verwandt.

Methode mit 80% (vgl. Tab. 3.17 und 3.18). Die hinsichtlich der Distanzen ermittelte gute Übereinstimmung der beiden Methoden war auch beim direkten Vergleich der Häufigkeitsverteilungen der Distanzen ersichtlich. Die Streuung der Distanzwerte war bei der RAPD-PCR größer (Daten nicht grafisch dargestellt).

Mit der RAPD-PCR-Methode ermittelten Hashmi & Gaugler (1998) mit 10 Primern zwischen den Arten *H.b.*, *H. indicus*, *H. hawaiiensis*, *H.m.*, *H.mar.* und *H. zealandica* eine durchschnittliche Distanz von etwa 69%, während Hashmi *et al.* (1996) mit 12 Primern im Vergleich der Arten *H.b.*, *H.m.*, *S.g.*, *S. carpocapsae* und *S.f.* eine Distanz von etwa 92% ermittelten. Liu & Berry (1996a) ermittelten mittels der RAPD-PCR-Methode (4 Primer) bei 14 *Steinernema*-Arten eine Distanz von 71-100%. Diese Distanzwerte liegen somit alle in der Größenordnung von etwa 70-100%.

Entsprechende Studien mit der ISSR-PCR-Methode gibt es für entomopathogene Nematoden noch nicht. In den Untersuchungen von Knaap *et al.* (1993) wurden ISSR-Primer zur Unterscheidung verschiedener sich von Bakterien ernährenden Boden-Nematoden inklusive drei Arten der Gattung *Caenorhabditis* geprüft. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung nachgewiesen. Bei 14 untersuchten geografischen Stämmen der Art *C. elegans* war die durchschnittliche Distanz etwa 3%, während die interspezifische Distanz zwischen den drei Arten bei über 90% lag. Die Autoren definierten daher für *Caenorhabditis* einen durch die ISSR-PCR-Methode abgegrenzten Genotyp (Stamm), wenn zwischen den Isolaten weniger als 10% Distanz festgestellt wurde.

Die in vorliegender Arbeit ermittelten Distanzwerte innerhalb einer Art lagen deutlich höher. Die größte durchschnittliche Distanz innerhalb einer Art (intraspezifisch) wurde mit etwa 47-48% bei beiden Methoden (RAPD und ISSR; Tab. 3.21) für *H. bacteriophora* ermittelt. Dieser relativ hohe Wert könnte dadurch bedingt sein, dass für diese Art 13 Stämme mit einer großen Streuung der Herkunftsorte (USA, GB, Deutschland, Italien, Türkei, China, Australien; siehe Tab. 2.3) untersucht wurden. Eine große genetische Distanz deutet darauf hin, dass innerhalb dieser Art eine starke Aufsplitterung erfolgte und somit eine hohe genetische Diversität vorliegt.

Hashmi & Gaugler (1998) ermittelten mit der RAPD-PCR-Methode (10 Primer) bei zwei Stämmen von *H. bacteriophora* eine genetische Distanz von etwa 17%. Mit 12 Primern ermittelten Hashmi *et al.* (1996) bei acht untersuchten Stämmen eine durchschnittliche Distanz von etwa 48%. Dieser Wert liegt somit in der gleichen Größenordnung wie die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Werte.

Bei der Art *H. megidis* wurde in vorliegender Arbeit der größte Unterschied in der berechneten genetischen Distanz zwischen den beiden Methoden ermittelt (RAPD: 36%, ISSR: 11%; vgl. Tab. 3.21). Besonders auf den Gelen der ISSR-PCR-Analyse war das Bandenmuster der vier untersuchten Stämme dieser Art sehr einheitlich. Bei der Interpretation ist zu berücksichtigen, dass alle vier untersuchten Stämme in Norddeutschland bzw. in den Niederlanden isoliert wurden, also aus einem räumlich begrenztem Gebiet stammten. Hashmi & Gaugler (1998) ermittelten mit der RAPD-PCR-Methode (10 Primer) für zwei Stämme dieser Art eine genetische Distanz von etwa 17%.

Bei der Art *S. glaseri* wurden in vorliegender Arbeit drei Stämme untersucht; die berechnete durchschnittliche genetische Distanz war bei der RAPD-PCR-Methode etwa 36%, bei der ISSR-PCR-Methode etwa 31% (Tab. 3.21). Liu & Berry (1995) ermittelten mittels der RAPD-PCR-Methode (5 Primer) zwischen zwei Stämmen dieser Art eine Distanz von etwa 52% und Liu & Berry (1996a) von 33% (4 Primer).

Die Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse in Dendrogrammen ließ mit keiner der beiden Methoden eine Gruppierung der Nematoden-Stämme nach Herkunftsgebieten erkennen. Lediglich die aus Süddeutschland isolierten Stämme von *H. bacteriophora* (HD01, MB2, HK3) und der in Italien isolierte Stamm IH127 wurden in den meisten Fällen der gleichen monophyletischen Gruppe zugeordnet. Die „Hybrid-Gruppe“ (kommerzieller Hybrid von *H.b.* und davon abgeleitete Re-Isolate, Inzuchtlinien und Selektionslinien) wurde in allen Fällen als monophyletische Gruppe dargestellt.

Größere Unstimmigkeiten zwischen den nach der Parsimony- und der UPGMA-Methode ermittelten Dendrogrammen ergaben sich bei der RAPD-PCR-Analyse (vgl. Abschnitt 3.7.1) bezüglich der Einordnung der Arten *C. elegans* und *H. marelatus*. Die ISSR-PCR-Analyse ergab hier eine weitgehend übereinstimmende Einordnung. Liu & Berry (1995, 1996a) gehen davon aus, dass die RAPD-PCR-Analyse einen zu hohen Polymorphiegrad zwischen den Arten angibt, als dass damit phylogenetische Studien auf Artniveau Sinn machen würden. Dagegen können Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb derselben Art eher analysiert werden (vgl. auch 4.6.2). Die ISSR-PCR-Methode nimmt eine Zwischenstellung ein, da sie sowohl auf Artniveau als auch innerhalb von Arten Verwandtschaften erkennen lässt.

Ein Großteil der bisher publizierten Untersuchungen mittels der ISSR-PCR wurde bei Pflanzen durchgeführt, bei denen der Polymorphismus von ISSR-Markern besonders groß und meist größer als der von RFLP- und RAPD-Markern ist (Godwin *et al.*, 1997; Fang *et al.*, 1997; Fang & Roose, 1997; Wolfe *et al.*, 1998; Gilbert *et al.*, 1999; Prevost & Wilkinson, 1999; Huang & Sun, 2000; Ammiraju *et al.*, 2001; Lefebvre *et al.*, 2001).

Ratnaparkhe *et al.* (1998) konnten mit ISSR-Markern Krankheitsresistenzgene bei Pflanzen aufspüren. Leroy *et al.* (2001) konnten mittels einer ISSR-PCR-Analyse sogar genetische Veränderungen bei Pflanzen (*Brassica*) während der *in vitro* Gewebekultur nachweisen. Reddy *et al.* (1999) konnten verschiedene Stämme des Seidenspinners (*Bombyx mori*) unterscheiden; der Polymorphismus war größer als bei der RAPD-PCR-Methode. Über Kreuzungsexperimente konnte gezeigt werden, dass die ISSR-Marker nach den Regeln von Mendel vererbt werden. Bei Vögeln werden ISSR-Marker zur Geschlechtsbestimmung eingesetzt (Wink *et al.*, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Inzucht- und Selektionslinien von EPN mittels der ISSR-PCR-Methode unterschieden werden können (Abschnitt 4.7.4). Diese Beispiele zeugen von der hohen Empfindlichkeit und den vielfältigen Anwendungsbereichen dieser Methode. Zur Ableitung weiterer vielversprechender ISSR-Primer-Sequenzen für EPN siehe Abschnitt 4.7.8.

4.7.2 Vergleich mit den Ergebnissen weiterer DNA-Fingerprinting-Methoden

In verschiedenen Arbeiten wurden die Methoden der RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*), AFLP (*amplified fragment length polymorphisms*), RAPD, ISSR und SSR (*simple sequence repeats*) bei Pflanzen verglichen. Die Übereinstimmung der Ergebnisse war in den meisten Fällen gegeben (z.B. Nagaoka & Ogihara, 1997). Der größte Polymorphismus wurde bei Mikrosatelliten (SSR) ermittelt (Rus-Kortekaas *et al.*, 1994; Powell *et al.*, 1996). Bei entomopathogenen Nematoden wurden bisher hauptsächlich RFLP- und RAPD-PCR-Analysen (vgl. 4.6.1) durchgeführt. Bei der RFLP-Methode wird ein Restriktionsverdau direkt mit genomischer DNA (vgl. Curran *et al.*, 1985) oder nach vorheriger PCR mit spezifischen Primern der ITS-Regionen (engl. *internal transcribed spacer*) ribosomaler DNA (rDNA) oder von mitochondrialer DNA durchgeführt (Joyce *et al.*, 1994; Triga *et al.*, 1999). Die Methode ist gut zur Unterscheidung von Arten geeignet, während sie sich zur Unterscheidung von Stämmen innerhalb einer Art weniger gut eignet (Curran *et al.*, 1985; Smits & Ehlers, 1991; Reid & Hominick, 1993). Zur Zuordnung einer Art wird von Hominick *et al.* (1997) die Analyse mit vier definierten Restriktionsenzymen empfohlen. Erst wenn diese Analyse keine eindeutige Zuordnung erlaubt, wird eine komplette Analyse mit weiteren Restriktionsenzymen notwendig. Reid & Hominick (1992) konnten mittels einer RFLP-Analyse in Großbritannien die Existenz von fünf Genotypen von *S. feltiae* und einer ähnlichen, aber noch nicht beschriebenen Art nachweisen. Im Gegensatz hierzu konnten Nasmith *et al.* (1996) keine Unterschiede im RFLP-Muster der rDNA von *S. feltiae* und *S. glaseri* finden.

Pamjav *et al.* (1999) wiesen mittels einer RFLP-Analyse von ITS-Regionen der rDNA innerhalb der Gattung *Heterorhabditis* vier Gruppen von Schwesternarten nach. Die auch in vorliegender Arbeit untersuchten Arten *H. bacteriophora*, *H. marelatus* und *H. megidis* wurden jeweils einer anderen Gruppe zugeordnet. Für die Gattung *Steinernema* lieferte die Methode ein eindeutigeres Bild als für die Gattung *Heterorhabditis*. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein (vgl. Abschnitt 3.7.1 und 3.7.2).

Grenier *et al.* (1996) konnten bei *H. bacteriophora* und *S. glaseri* artspezifische, sich tandemartig wiederholende *AluI* DNA-Abschnitte nachweisen. Auch mit dieser Methode sind jedoch intraspezifische Unterscheidungen kaum möglich (vgl. auch Grenier *et al.*, 1997).

Die AFLP-Analyse ist eine weitere vergleichsweise neue DNA-*Fingerprinting*-Methode, bei der ein Restriktionsverdau genomischer DNA mit einer selektiven Amplifikation von Restriktionsfragmenten durch eine PCR gekoppelt ist (Vos *et al.*, 1995). Die Bandenmuster sind gut reproduzierbar. Diese Methode sollte bei entomopathogenen Nematoden geprüft werden. Ein Nachteil dieser Methode ist der höhere Aufwand und der relativ hohe Bedarf an genomischer DNA (0,5-1 µg). Bei der ISSR-PCR-Methode kann dagegen ein einzelner Nematode (oder sogar nur Teile davon) in der PCR eingesetzt werden, was den Arbeits-, Zeit- und Materialaufwand erheblich reduziert.

Die klassische Mikrosatelliten-PCR wäre eine weitere in Frage kommende Technik, um die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gestellten Fragen zu beantworten. Die Entwicklung entsprechender Primer ist jedoch vergleichsweise aufwendig (z.B. Godwin *et al.*, 1997).

4.7.3 Vergleich mit phylogenetischen Studien

Phylogenetische Studien beruhen heute meist auf Sequenzvergleichen bestimmter Gene. Die im folgenden Abschnitt aufgeführten Ergebnisse einschlägiger Studien sollen einen Vergleich mit den Ergebnissen der angewandten molekularen Methoden dieser Arbeit ermöglichen. Einen direkten Vergleich der rekonstruierten Phylogenie, die einerseits aus den Sequenzen zweier Gene der Chloroplasten und andererseits mittels ISSR-PCR-Analysen abgeleitet wurde, führten Treutlein *et al.* (2003) durch.

In den meisten phylogenetischen Studien bei entomopathogenen Nematoden wird *Caenorhabditis* zu Vergleichszwecken mit untersucht und als Außengruppe definiert.

Die nahe Verwandtschaft zwischen *C. elegans* und *H. bacteriophora* konnte durch Blaxter *et al.* (1998) durch Sequenzvergleiche der kleinen Untereinheit (SSU, engl. *small subunit*) ribosomaler DNA belegt werden. In den daraus abgeleiteten Phylogrammen befindet sich die

Art *H. bacteriophora* auf dem selben Seitenzweig wie *C. elegans*, während die Art *S. carpocapsae* auf einem anderen Seitenzweig steht und eine mehr als doppelt so große relative Distanz zu *C. elegans* aufweist.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der RAPD- und ISSR-PCR-Methode zwischen der Gattung *Heterorhabditis* und *C. elegans* eine durchschnittliche Distanz von etwa 83% und zwischen der Gattung *Steinernema* und *C. elegans* von 85-90% ermittelt (Tab. 3.17 und 3.18). Nach Liu *et al.* (1997) waren beim Sequenzvergleich von 18 S rDNA die Differenzen zwischen den Arten innerhalb der Gattung *Heterorhabditis* nur sehr klein, lediglich *H. megidis* und *H. marelatus* konnten „herausgetrennt“ und in einer monophyletischen Gruppe zusammengefasst werden. Die untersuchten *Steinernema*-Arten konnten dagegen deutlicher getrennt werden, die ermittelten Verwandtschaftsverhältnisse stimmen weitgehend mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten überein. Auch die Vergleiche von ITS1-Sequenzen der rDNA durch Adams *et al.* (1998) und Adams (2001) ergaben, dass sich die Arten *H. megidis* und *H. marelatus* einander näher stehen als jeweils zu *H. bacteriophora*. Adams (2001) diskutiert sowohl für *H. bacteriophora* als auch für *H. megidis* die Auftrennung der Arten in weitere eigene Arten (vgl. hierzu auch Dix & Burnell, 2001).

Liu *et al.* (1999) konnten durch Sequenzvergleiche mitochondrialer ND4-Gene geografische Stämme von *H. bacteriophora* nicht weiter in Gruppen aufspalten, während dies bei den Arten *H. megidis* und *H. marelatus* möglich war. Die Autoren vermuten, dass *H. bacteriophora* durch den Menschen weltweit verbreitet wurde und daher die Stämme so einheitlich sind. Mit den DNA-Fingerprinting-Methoden, die in der vorliegenden Arbeit angewandt wurden, war *H. bacteriophora* im Gegensatz hierzu die Art mit der größten genetischen Divergenz (d.h. der größten durchschnittlichen Distanz zwischen den Stämmen; vgl. Abschnitt 4.7.1). Dies ist jedoch kein Widerspruch, denn die mittels der DNA-Fingerprinting-Methode ausgewerteten DNA-Abschnitte sind meist nicht-codierende Abschnitte und daher, gerade über kurze Zeiträume betrachtet, weitaus variabler als die codierenden Abschnitte von Genen (vgl. Abschnitt 4.7.8).

4.7.4 Unterscheidung der Re-Isolate, Inzuchtlinien und Selektionslinien

In der vorliegenden Arbeit wurden einige Re-Isolate untersucht, die einige Zeit nach einer Freilandapplikation des kommerziellen *H. bacteriophora* Hybrid-Stammes aus dem behandelten Boden isoliert worden waren. Diese Re-Isolate konnten deutlich vom Hybrid-Stamm unterschieden werden, insbesondere die beiden Isolate „Re02“ und „Re08“. Die durchschnittliche Distanz innerhalb dieser Gruppe betrug bei beiden Methoden etwa 35-37%

(Tab. 3.21). Im Vergleich mit der durchschnittlichen Distanz zwischen geografischen Stämmen der Art *H. bacteriophora* (47-48%) ist dieser Wert relativ hoch. Dies deutet darauf hin, dass sich die in Flüssigkultur vermehrten Nematoden nach ihrer Ausbringung ins Freiland genetisch veränderten. Grundlage für diese genetischen Veränderungen könnte eine verschärfte Selektion unter den Freilandbedingungen sein. Der erhöhte Selektionsdruck wirkt möglicherweise der im Vorfeld erfolgten Selektion auf Linien, die den Bedingungen der Flüssigkultur angepasst sind (vgl. Kapitel 4.6), entgegen. Dieser Effekt kann dadurch verschärft werden, dass ein Großteil der ausgebrachten Nematoden bereits kurz nach der Ausbringung stirbt (Ehlers & Peters, 1998), also eine Art „Flaschenhalseffekt“ auftritt. Auch eine Kreuzung mit einem lokal vorkommenden Stamm wäre denkbar, ist aber weitgehend auszuschließen, da die Art *H. bacteriophora* in Deutschland relativ selten vorkommt und in den untersuchten Bodenproben vor der Ausbringung kaum jemals nachgewiesen werden konnte (Ehlers, 2000; pers. Mitteilung; vgl. Abschnitt 4.1.6).

Die Bandenmuster der Inzuchtlinien des Hybrid-Stammes PS7 von *H. bacteriophora* waren bei beiden Methoden recht einheitlich, die durchschnittliche Distanz zwischen den Inzuchtlinien lag bei der RAPD-PCR bei etwa 16% (Tab. 3.21 und 8.6) und bei der ISSR-PCR bei etwa 19% (Tab. 3.21 und 8.8). Die durchschnittlichen Distanzen zwischen den Inzuchtlinien reichten für die einzelnen Primer der ISSR-PCR von 0-48% (Tab. 3.19). Die Primer sind zur Unterscheidung der Inzuchtlinien also unterschiedlich gut geeignet. Die zum Teil recht hohen Distanzwerte für einzelne Primer lassen sich durch die geringe Gesamtzahl ausgewerteter Banden pro Primer erklären (vgl. Abb. 8.19-8.26). Wurden für einen Primer z.B. insgesamt zwei Banden ausgewertet, ergibt das Fehlen einer Bande bei einer Inzuchtlinie bereits einen Distanzwert von 50%. Wird die durchschnittliche Distanz aus den Distanzen jedes einzelnen Primers berechnet, ergibt sich daher ein höherer Wert (29%) als wenn sie nach der Auswertung der gesamten Matrix berechnet wird (19%; vgl. Tab. 3.19 und 3.21).

Shapiro *et al.* (1997) ermittelten mit der RAPD-PCR-Methode (14 Primer) bei jeweils 15 Inzuchtlinien zweier *H. bacteriophora*-Stämme eine durchschnittliche Distanz von 14% bzw. 24% (Durchschnittswert aus den Distanzwerten der einzelnen Primer), wobei die Distanzen für die einzelnen Primer im Bereich von 0-59% lagen.

Die Distanz der Selektionslinie des Hybrid-Stammes von *H. bacteriophora* zum Ausgangsstamm lag für beide Methoden in der gleichen Größenordnung wie bei den Inzuchtlinien. Daraus lässt sich schließen, dass die Selektion über Wirtspassagen über mehrere Zyklen der selektionsneutralen Etablierung einer Inzuchtlinie gleich kommt (vgl. Abschnitt 2.2.6). Die Differenzen im ISSR-PCR-Muster zwischen der Selektionslinie und

dem Ausgangsstamm trotz ausbleibender Selektionswirkung (= Selektionserfolg) sowie die Ergebnisse der Untersuchungen zur Befallsstrategie bestätigen die selektionsneutrale Veränderung des genetischen Fingerabdrucks (vgl. Abschnitt 4.3.3, 4.4.10, Kapitel 4.5 und Abschnitt 4.7.8). Einen weiteren Beleg für diese Hypothese lieferten die Ergebnisse aus der Sequenzierung der DNA einiger Banden der ISSR-Gele (Abschnitt 4.7.8). Der Befund, dass bei der Selektion über Wirtspassagen in *M. melolontha*-Larven pro Zyklus nur wenige Dauerlarven zur Vermehrung kamen, legt nahe, dass es zu einer genetischen Drift kam (vgl. Abschnitt 4.5.3).

Im Gegensatz hierzu war bei *S. glaseri* die über die ISSR-PCR-Methode ermittelte Distanz zwischen den zwei Selektionslinien und dem Ausgangsstamm deutlich höher (26%, Tab. 3.21) und erreichte fast den Distanzwert zwischen den drei geografischen Stämmen (31%, Tab. 3.21). Dieser relativ hohe Distanzwert ist ein Hinweis dafür, dass sich die Selektion bei *S. glaseri* stärker auf das Bandenmuster auswirkte als bei *H. bacteriophora*. Dies wiederum könnte auf der höheren Selektionsintensität und -wirkung bei *S. glaseri* beruhen (vgl. Kapitel 4.5 und Abschnitt 4.5.4). Bei der RAPD-PCR-Methode ergab sich im Vergleich zur ISSR-PCR-Methode zwischen den Selektionslinien von *S. glaseri* jedoch ein weitaus geringerer Distanzwert von etwa 7%. Möglicherweise lag dies an der geringeren Empfindlichkeit der Auftrennung und des Nachweises der DNA-Fragmente bei der RAPD-PCR-Methode (vgl. Abschnitt 2.8.12 und 2.8.13).

4.7.5 Die im Freiland isolierten *Heterorhabditis*-Stämme „MB1“ und „MB2“

Die während eines Freilandversuches am Kaiserstuhl isolierten Nematoden konnten mittels der DNA-Fingerprinting-Methoden der Art *H. bacteriophora* zugeordnet werden. Allerdings waren die Bandenmuster der ISSR-PCR-Analyse der beiden Isolate dermaßen verschieden, dass eine eindeutige Unterscheidung möglich war (Abschnitt 3.7.1 und 3.7.2). Trotz räumlicher Nähe der Fundstellen ist daher davon auszugehen, dass es sich um verschiedene Genotypen handelt. Das RAPD-PCR-Bandenmuster von MB1 entsprach dem eines typischen *H. bacteriophora*-Stammes, die Einordnung im Dendrogramm erfolgte nahe der Basis-Verzweigung dieser Art (Abb. 3.51 und 3.52). Von MB2 konnte leider keine RAPD-PCR-Analyse angefertigt werden. Bei der ISSR-PCR-Analyse ergab sich für MB1 eine ähnliche Stellung im Dendrogramm wie bei der RAPD-PCR-Analyse, während der Stamm MB2 nahe dem in der Nähe von Darmstadt isolierten Stamm HD01 eingeordnet wurde (Abb. 3.53-3.55). Es scheint zunächst nicht plausibel zu sein, dass zwei Nematodenisolate der gleichen Art aus dem gleichen Gebiet nicht identisch sind. Mögliche Erklärungen für dieses Phänomen ist die

Einschleppung eines Stammes aus einem anderen Gebiet, z.B. über Erdbewegungen durch den Menschen. Für die Art *S. feltiae* konnte gezeigt werden, dass die Nematoden auch durch befallene Insekten, bevor diese sterben, über größere Entfernungen verbreitet werden können (Reid & Hominick, 1992). Die Verteilung entomopathogener Nematoden im Boden ist sehr zerstreut (engl. „*patchy distribution*“) (Campbell, *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1999; Adams, 2001). Ein genetischer Austausch zwischen Teilpopulationen dürfte dadurch erschwert sein. Eine Verteilung der Nematoden durch Eigenbewegung im Boden geht vermutlich nur sehr langsam vonstatten (vgl. Kaya, 1990). Da die Reproduktion der Nematoden ausschließlich innerhalb eines Wirts stattfindet, ist eine genetische Vermischung zweier Stämme unter Freilandbedingungen nur dann möglich, wenn beide Stämme etwa zur gleichen Zeit den selben Wirt befallen. Dies dürfte unter natürlichen Bedingungen nur mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit vorkommen. Die Untersuchungen zur Befallsstrategie von *H. bacteriophora* (vgl. Kapitel 4.4) legen nahe, dass unter Freilandbedingungen vermutlich nur wenige Dauerlarven erfolgreich in einen Wirt eindringen, d.h. in einem befallenen Wirt finden sich meist die Nachkommen weniger Individuen, im Extremfall eines einzigen Individuums. Da beide Stämme aus befallenen *Melolontha*-Larven isoliert wurden (und nicht aus Bodenproben), repräsentierten die daraus isolierten Nachkommen bereits eine genetisch relativ einheitliche Linie. Die Unterschiede zwischen den beiden Isolaten dürften auch aus diesem Grund um so größer ausfallen. Reid & Hominick (1992) konnten mittels RFLP-Analysen in Großbritannien fünf Genotypen morphologisch sehr ähnlicher *Steinernema*-Isolate nachweisen. Die fünf Genotypen wurden Kreuzungsstudien und geringfügigen morphologischen Unterschieden zufolge in zwei Gruppen eingeteilt, von denen eine der Art *S. feltiae* zugeordnet werden konnte. Die Kreuzungsschwierigkeiten der Genotypen deuten möglicherweise die Differenzierung der Genotypen zu Arten an. Der zum Zeitpunkt der Kreuzung unterschiedlich hohe Anteil infektiöser Dauerlarven (Bohan & Hominick, 1995; vgl. Abschnitt 4.4.3) der Genotypen (Stämme) wurde als Grund dafür in Erwägung gezogen, dass die aus demselben Wirt wandernden Dauerlarven stets nur einem Genotyp angehörten. Dix & Burnell (2001) stellten fest, dass die Kreuzung zahlreicher Stämme von *H. bacteriophora* nicht gelingt, obwohl das RFLP-Profil der ITS rDNA der Stämme identisch war. Dies weist auf die Existenz von Reproduktionsbarrieren hin und belegt die ökologische Divergenz der Stämme. Die Mechanismen dieser Reproduktionsbarrieren sind noch völlig unklar.

Die weitere Untersuchung von Freilandpopulationen entomopathogener Nematoden mittels empfindlicher molekularbiologischer Methoden wie der ISSR-PCR könnte helfen,

interessanten populationsökologischen Fragestellungen, z.B. wie viele Genotypen einer Art in einem Habitat nachweisbar sind und welche Mechanismen zu deren Etablierung führen, nachzugehen (vgl. Campbell *et al.*, 1998; Adams, 2001).

4.7.6 Einordnung der *Steinernema*-Stämme „E“ und „Marokko Devil“

Der *Steinernema*-Stamm „E“ stammte aus der Sammlung des Phytopathologischen Instituts der Universität Kiel und war ursprünglich als ein *S. glaseri*-Stamm ausgewiesen. In einigen Biotests gegen *Melolontha*-Larven war keine Infektiosität erkennbar (Daten nicht dargestellt), außerdem waren die Dauerlarven relativ (untypisch) klein. Der Stamm wurde daher extra untersucht und konnte mittels der RAPD- bzw. ISSR-PCR-Analyse deutlich von den drei *S. glaseri*-Stämmen unterschieden werden: 62% Distanz zu den drei *S.g.*-Stämmen im Vergleich zu 31% Distanz innerhalb dieser drei Stämme bei der ISSR-PCR-Analyse (vgl. Tab. 8.7 und 8.8). Eine eindeutige Zuordnung zu einer anderen *Steinernema*-Art war nicht möglich. Der Stamm wurde in den Dendrogrammen an der Basis von *S. glaseri* eingeordnet und steht demnach zwischen *S. glaseri* und der Gruppe aus *S. arenaria* und *S. feltiae*. Möglicherweise wurde der Stamm versehentlich einmal mit einer anderen Art vermischt oder es lag eine Verwechslung vor (Peters, 2000; pers. Mitteilung). Der genaue Ursprung konnte jedoch nicht mehr nachvollzogen werden.

Der *Steinernema*-Stamm „Marokko Devil“ wurde vor kurzem (2000) in Marokko aus Larven von *Rhizotrogus* (Coleoptera: Scarabaeidae) isoliert. Im Biotest stellte er sich als relativ „aggressiv“ gegenüber *Melolontha*- und *Amphimallon*-Larven heraus (Abschnitt 4.1.1, Tab. 3.1). Morphologisch hatte das Isolat lediglich eine gewisse Ähnlichkeit mit der Art *S. puertoicense*, von der jedoch keine lebenden Exemplare mehr vorhanden sind. Ein RFLP-Muster war angeblich ebenfalls ähnlich (Peters, 2002; pers. Mitteilung). Die in vorliegender Arbeit durchgeführte RAPD-PCR-Analyse stellte den Stamm an die Basis aller übrigen *Steinernema*-Arten (Abb. 3.51 und 3.52), d.h. es war keine nähere Verwandtschaft zu einer anderen *Steinernema*-Art festzustellen: Die Distanz zu *S. arenaria* war 58%, zu *S. feltiae* 63% und zu *S. glaseri* 65%. Die Distanzen entsprechen in etwa denen, die zwischen diesen drei bekannten *Steinernema*-Arten ermittelt wurden (Tab. 3.17).

Die ISSR-PCR-Analyse ergab dagegen für den Stamm „Marokko Devil“ eine nähere Verwandtschaft mit *S. arenaria* und *S. feltiae*: 41% bzw. 59% Distanz (Tab. 8.7, Abb. 3.53-3.55). Eine nähere Verwandtschaft mit *S. glaseri* scheint nicht zu bestehen; der Distanzwert war etwa 73%. Die Distanzen weisen auch hier darauf hin, dass es sich bei dem Isolat um eine eigene (neue) Art handelt (vgl. Tab. 8.7).

Der Stamm „Marokko Devil“ wurde in der Arbeitsgruppe von Dr. R.-U. Ehlers bereits in Flüssigmedium kultiviert. Die DNA einer solchen Charge wurde ebenfalls untersucht (= „Devil-FK“, FK = Flüssigkultur). Erstaunlicherweise konnte zwischen dem Ausgangsstamm und der Charge aus der Flüssigkultur eine relativ große Distanz von 23% (RAPD) bzw. 44% (ISSR) ermittelt werden (Tab. 3.21). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass während der Flüssigkultur ein hoher Selektionsdruck den Stamm genetisch verändert hat. Diese Veränderung (Anpassung) war möglicherweise deshalb so ausgeprägt, weil es sich bei dem Ausgangsstamm um einen echten „Wildstamm“ handelte, der noch keine Laboranpassungen aufwies. Eine Charge aus der Flüssigkultur war im Biotest (Testsystem I) gegen *Melolontha*-Larven jedoch nicht mehr infektiös (Daten nicht dargestellt). Als Ursache hierfür könnte eine Selektion auf nicht infektiöse Linien während der Flüssigkultur oder eine Kontamination mit Fremdbakterien bzw. ein Verlust der eigentlichen symbiotischen Bakterien in Frage kommen (Peters, 2001; pers. Mitteilung). Dieser Befund ist für die kommerzielle *in vitro* Produktion von EPN von grundsätzlicher Bedeutung, da geklärt werden muss, über wie viele *in vitro* Vermehrungsschritte die spezifische Wirksamkeit bzw. Pathogenität ausreichend stabil bleibt (vgl. Kapitel 4.5 sowie Abschnitt 4.6.5 und 4.6.7). Um eventuelle (noch unbekannt) Degenerationen der Nematoden zu vermeiden, werden die Flüssigkulturen meist von einem „unverbrauchten“ Stamm ausgehend aufgebaut. Dieser Stamm wird zur Erhaltung in kleinem Maßstab *in vivo* vermehrt oder z.B. in flüssigem Stickstoff konserviert (Peters, 2002; pers. Mitteilung; vgl. Abschnitt 4.6.5).

4.7.7 Beurteilung der Reproduzierbarkeit der Methoden

Für fast alle eingesetzten Primer wurden für jeden Nematoden-Stamm drei PCR-Experimente durchgeführt, wobei die DNA aus zwei unabhängigen Isolationen stammte. Hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Banden war die ISSR- der RAPD-PCR-Methode deutlich überlegen. In der RAPD kam es häufiger zu Unstimmigkeiten, weil z.B. eine bestimmte Bande im Gel nicht eindeutig reproduziert werden konnte. Dies war häufig unabhängig von der Stärke der Bande, d.h. es gab starke Banden, die nicht und schwache, die eindeutig reproduziert wurden. Die Gründe hierfür sind bei der RAPD-PCR-Methode in erster Linie die kurzen Primer und die dadurch bedingten niedrigeren *Annealing*-Temperaturen während der PCR. Dadurch ist die Spezifität und die Stärke der Anlagerung des Primers an einen der Sequenz entsprechenden Abschnitt der genomischen DNA relativ schwach und es kann leichter zu einer „Fehlanlagerungen“ kommen (engl. *low stringency*-Bereich), die zur Amplifikation eines anderen Produktes führt (vgl. z.B. Jones *et al.*, 1997; Hernández *et al.*, 1999).

Der hohe Grad der Reproduzierbarkeit der ISSR-PCR-Methode wird bei Betrachtung der relativ einheitlichen Bandenmuster von wenig polymorphen Primern bei den Inzuchtlinien deutlich (z.B. (GA)₈YG, Abb. 8.12 A). Auch die mit der DNA aus einzelnen Nematoden durchgeführten ISSR-PCR-Analysen ergaben ein sehr einheitliches Bandenmuster (Abb. 8.25 B), d.h. die DNA eines einzelnen Nematoden ist hinreichend repräsentativ. Knaap *et al.* (1993) erhielten bei ihren ISSR-PCR-Analysen mit gepoolter DNA bzw. DNA von einzelnen Nematoden (oder aus Eiern) nahezu die gleichen Muster. Hashmi & Gaugler (1998) ermittelten mit der DNA aus einzelnen Nematoden mit RAPD-Primern eine durchschnittliche Übereinstimmung von 96%.

Bei einigen der ISSR-Primer mit gleicher Wiederholungssequenz aber unterschiedlicher Verankerung ergab sich bei den einzelnen Stämmen ein nahezu identisches Bandenmuster. Die unterschiedliche Verankerung, die häufig durch die Änderung einer einzigen Base am 3'- oder 5'-Ende des Primers gegeben war, wirkte sich offensichtlich nicht auf die Anlagerung des Primers an den entsprechenden DNA-Abschnitten aus (vgl. z.B. Primer CY(GACA)₄ mit TK(GACA)₄, Abb. 8.15 B und 8.16 B). Daher können die entsprechenden PCRs als weiterer Beweis der hohen Reproduzierbarkeit der Methode angesehen werden.

Die am 5'-Ende verankerten Primer ergaben im Vergleich zu den 3'-verankerten qualitativ und quantitativ gleichwertige Bandenmuster auf dem Gel. Reddy *et al.* (1999) berichten dagegen, dass die 5'-verankerten Primer häufig weniger, dafür aber schärfere Banden produzierten.

Bei der ISSR-PCR-Analyse war die Reproduzierbarkeit weniger von der PCR als von der Qualität der Silberfärbung der Polyacrylamidgele abhängig. Dies wurde deutlich, wenn mehrere Gele mit Aliquots des selben PCR-Ansatzes gefärbt und verglichen wurden. Die Silberfärbung konnte jedoch im Laufe der Arbeit optimiert werden (Abschnitt 2.8.13).

Die manuelle Auswertung der Gele verlangte Entscheidungen, die in einigen Fällen sicher etwas subjektiv waren, z.B. ab welcher Intensität eine Bande berücksichtigt wird oder ob zwei Banden wirklich auf gleicher Höhe des Gels liegen (homologe Genorte repräsentieren; vgl. hierzu z.B. Weising *et al.*, 1995). Im oberen Bereich der Gele (Länge der DNA-Fragmente > 2000 bp) waren häufig sehr viele Banden und teilweise ein indifferenter „Schmier“ vorhanden, so dass aus diesem Bereich kaum Banden ausgewertet wurden. Da die Auswertung der Gele ausschließlich von mir vorgenommen wurde, ist durchaus ein „interner“ Maßstab bzw. „Standard“ gegeben. Eventuelle Fehleinschätzungen dürften sich durch die große Zahl der ausgewerteten Banden und durch die Wiederholungen (Vergleich mehrerer Gele) ausgeglichen haben. Die Abweichungen dürften sich auf die Gesamtauswertung

bezogen im Bereich weniger Prozent bewegen und hätten damit auf das Gesamtergebnis keinen wesentlichen Einfluss.

4.7.8 Sequenzierung ausgewählter PCR-Produkte

Einige der in der ISSR-PCR amplifizierten DNA-Fragmente wurden direkt oder nach einer Klonierung sequenziert. Ziel dieser Sequenzierung war zu prüfen, ob bei den amplifizierten DNA-Fragmenten codierende DNA-Abschnitte enthalten sind. Ein weiteres Ziel war die Entwicklung spezifischerer Primer (vgl. Leroy *et al.*, 2001).

Für keine der erhaltenen Sequenzen konnten in der Datenbank-Recherche (BLAST) homologe Sequenzen nachgewiesen werden (Abschnitt 3.7.4). Es handelte sich daher bei allen sequenzierten ISSR-PCR-Produkten mit hoher Wahrscheinlichkeit um nicht codierende Sequenzen. Der Befund, dass trotz Fehlens einer nachweisbaren positiven Selektionswirkung die Selektionslinie von *H. bacteriophora* anhand ihres ISSR-Musters unterscheidbar vom Ausgangsstamm war, weist ebenfalls darauf hin, dass die ISSR-Marker nicht codierende DNA-Abschnitte repräsentieren. Leroy *et al.* (2001) konnten bei genomischer DNA aus Pflanzen (*Brassica*) unter fünf sequenzierten ISSR-PCR-Produkten ein Produkt mit hoher Sequenzhomologie zu einer Serin-Threonin-Kinase nachweisen, die eine Rolle bei der Zellproliferation spielt. Demzufolge ist die Detektion einer codierenden Sequenz mit dieser Methode durchaus möglich. Handelt es sich dabei um ein polymorphes PCR-Produkt, lassen sich eventuell Rückschlüsse auf Eigenschaften (exprimierte Gene) der jeweiligen Stämme ziehen.

Tóth *et al.* (2000) untersuchten das Genom verschiedener Organismen gezielt auf das Vorkommen, die Lokalisation (in Introns, Exons oder *intergenic regions*) und die Häufigkeit von *simple sequence repeats* (SSRs) der Länge von 1 bis 6 Basenpaaren aller denkbaren Basenkombinationen. Für *C. elegans* wurde die größte Dichte an SSRs in *intergenic regions* festgestellt, wobei das Dinucleotid-Motiv „AG“ (entspricht „GA“) am häufigsten vorkam. In Introns waren Mono-, Di-, und Hexanucleotid-Motive etwa gleich häufig, das häufigste Dinucleotid-Motiv war „AT“. Die geringste Häufigkeit von SSRs war bei allen untersuchten Organismen in den Exons zu finden, innerhalb derer stets Trinucleotid-Motive die häufigsten SSRs waren; bei *C. elegans* kam „AAG“ am häufigsten und „ACC“ am zweithäufigsten vor.

Sowohl die ISSR-PCR-Profile als auch die Ergebnisse der Sequenzierung der vorliegenden Arbeit sind mit den Ergebnissen von Tóth *et al.* (2000) kongruent. Die Primer mit dem Basen-Motiv „GA“ ergaben z.B. meist zahlreiche PCR-Produkte (siehe z.B. Tab. 3.20). Für die

Ableitung weiterer ISSR-Primer-Sequenzen, die bei EPN gute Ergebnisse erwarten lassen, sei daher auf Tóth *et al.* (2000) verwiesen (siehe auch www.genetics.elte.hu/ssr).

Die Sequenzübereinstimmung von DNA-Fragmenten aus Banden auf gleicher Höhe des Gels wurde nicht extra untersucht. Knaap *et al.* (1993) ermittelten nach einem Restriktionsverdau der ISSR-PCR-Produkte auf gleicher Höhe des Gels die gleichen paarweisen Distanzen zwischen den untersuchten Nematoden-Stämmen wie mit den PCR-Produkten selbst. Dies beweist die Übereinstimmung der Sequenzen.

Ein weiteres Ziel der Sequenzierung war die Entwicklung spezifischerer Primer z.B. für die Charakterisierung einzelner Inzuchtlinien oder Gruppen von Inzuchtlinien. Solche Primer könnten zur zweifelsfreien Identifizierung von Linien in Zuchtprogrammen dienen (vgl. z.B. Reddy *et al.*, 1999; Ammiraju *et al.*, 2001). Für das DNA-Fragment der Bande „B2“ des ISSR-Primers (GA)₈RC (vgl. Abb. 8.19 B und Abschnitt 3.7.4) wurden für das 3'- und 5'-Ende spezifische 22mer Primer entwickelt. Die mit diesen Primern durchgeführte PCR mit genomischer DNA als Vorlage war jedoch nicht erfolgreich (Daten nicht dargestellt). Weitere Experimente in diese Richtung wurden jedoch nicht durchgeführt.

Hernández *et al.* (1999) und Hernández *et al.* (2001) entwickelten ausgehend von polymorphen RAPD-PCR-Produkten verlängerte Primer mit größerer Spezifität. Bei der direkten Sequenzierung war das größte Problem, dass aufgrund von Fehlanlagerungen des Primers häufig Nichtziel-DNA reamplifiziert wurde (vgl. Abschnitt 4.7.7). Diese Gefahr dürfte bei der ISSR-PCR jedoch aufgrund der stringenteren PCR-Bedingungen und der längeren Primer nicht so groß sein.

Die direkte Sequenzierung von DNA-Fragmenten nach einer PCR mit zwei verschiedenen Primern klappte meist nicht auf Anhieb und nicht bei allen Primer-Kombinationen (vgl. Abschnitt 3.7.4). Erst nach Anpassung der Konzentration der DNA und der Primer konnte ein Teil der PCR-Produkte sequenziert werden. Die Gründe für das Scheitern der Sequenzierung können unbekannte Konstellationen während der Sequenzierungsreaktion sein, die z.B. von der Länge und der Sequenz der Primer als auch der DNA-Fragmente abhängen (Pamela Okun, 2002; pers. Mitteilung).

Die Vergleiche der genetischen Distanzen mit den phänotypischen Distanzen der Merkmale „Infektiosität“, „Penetrationaktivität“, „Vermehrungspotential in *Tenebrio*-Larven und in Flüssigkultur“ sowie „*recovery* in Flüssigkultur“ für alle Paarkombinationen der Inzuchtlinien ergab, dass keine Korrelationen bestanden (Abschnitt 3.7.2). Dies beweist, dass die ISSR-

PCR-Profile keine Rückschlüsse auf die Ausprägung der untersuchten Merkmale zulässt. Auch dies lässt darauf schließen, dass die in der ISSR-PCR amplifizierten DNA-Abschnitte größtenteils nicht-codierende Bereiche repräsentieren. Das schließt jedoch nicht aus, dass an Gene gekoppelte ISSR-Marker bzw. Marker, die selbst Gensequenzen repräsentieren, vorhanden sind (siehe oben in diesem Abschnitt). Lefebvre *et al.* (2001) fanden bei Inzuchtlinien von Pfefferpflanzen dagegen eine hohe Korrelation zwischen den über AFLP- bzw. RAPD-Analysen ermittelten genetischen Distanzen und den phänotypischen Distanzen (= Mahalanobis-Distanzen), die aus 41 verschiedenen Merkmalen berechnet wurden.

5. Zusammenfassung

Entomopathogene Nematoden (Fadenwürmer) der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema* werden zur biologischen Bekämpfung von im Boden lebenden Schadinsekten eingesetzt. Die infektiösen Larven dieser Nematoden (Dauerlarven) beherbergen in ihrem Darm symbiotische Bakterien, die für die pathogene Wirkung verantwortlich sind.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Infektionsbiologie und Wirkbedingungen dieser Nematoden bei Larven (Engerlingen) des Feld- und Waldmaikäfers (*Melolontha melolontha* und *M. hippocastani*) sowie des Junikäfers (*Amphimallon solstitialis*). Es wurden verschiedene Nematodenarten und -stämme getestet und bei zwei Arten wurde geprüft, ob deren Wirksamkeit durch Selektion gesteigert werden kann.

Die aus den USA stammende Art *S. glaseri* und ein neu in Marokko isolierter *Steinernema*-Stamm hatten mit 60-85% bei 1000 applizierten Dauerlarven pro Engerling die größte Wirksamkeit. Die *Heterorhabditis*-Stämme erreichten nur 5-25%. Eine Vorinfektion der Engerlinge mit Rickettsien erhöhte jedoch die Wirksamkeit um den Faktor 3-6. In lehmigem Bodensubstrat war die Wirksamkeit beider Nematodenarten deutlich geringer als in sandigem. Das L2-Stadium der Engerlinge war deutlich anfälliger als das L3-Stadium.

Die Infektiosität von *H. bacteriophora* (kommerzieller Hybrid-Stamm, E-Nema) gegenüber Larven des Feldmaikäfers ließ sich durch Selektion über Wirtspassagen nicht steigern, die ermittelte realisierte Heritabilität war nahezu null. Im Gegensatz hierzu konnte bei *S. glaseri* (North Carolina) die Infektiosität durch 10 Wirtspassagen um den Faktor 9-15 gesteigert werden, die ermittelte realisierte Heritabilität war etwa 0,7. Auffällig war, dass die Länge der Dauerlarven von *S. glaseri* während der Selektion um etwa 20% zunahm und der Fettgehalt dieser Dauerlarven signifikant erhöht war.

Die Selektionswirkungen lassen sich durch die unterschiedlichen Befallsstrategien deuten. Für beide Nematodenarten war die Wahrscheinlichkeit der sekundären Penetration von Dauerlarven in einen Engerling (nachdem bereits eine Dauerlarve eingedrungen ist) sehr viel höher ist als für die primäre Penetration (= Eindringen der ersten Dauerlarve). Der Unterschied war besonders ausgeprägt bei *H. bacteriophora*. Diese Art hat demzufolge größere Schwierigkeiten, in einen Engerling einzudringen. Es penetrieren nur wenige Dauerlarven, aber bereits 1-3 im Hämocoel genügen, um den Engerling durch die hoch virulenten symbiotischen Bakterien zu töten („Einzelkampfstrategie“). Die geringe Überlebensrate primär penetrierter Dauerlarven und weitere exo- und endogene Faktoren wurden als Ursache für die schwankende Wirksamkeit und das Ausbleiben einer positiven Selektionswirkung diskutiert.

Bei *S. glaseri* penetriert eine größere Zahl von Dauerlarven und die Überlebensrate primär penetrierter Dauerlarven ist höher. Durch die geringe Virulenz der symbiotischen Bakterien ist eine Mindestzahl von etwa 15-50 penetrierten Dauerlarven nötig, um den Engerling zu töten („Gruppenstrategie“). Der Selektionsdruck konnte durch die Reduzierung der Anzahl applizierter Nematoden sukzessive erhöht werden.

Zur Überprüfung, ob sich die Selektionslinien und Re-Isolate von Freilandapplikationen anhand von molekularen Markern von den Ausgangsstämmen unterscheiden lassen, wurden die Methoden der RAPD-PCR (*random amplified polymorphic DNA - polymerase chain reaction*) und der ISSR-PCR (*inter simple sequence repeats*) angewandt. Die mittels der RAPD- bzw. der ISSR-PCR-Analyse ermittelte durchschnittliche genetische Distanz zwischen den Arten *H. bacteriophora*, *H. marelatus*, *H. megidis*, *S. arenaria*, *S. feltiae*, *S. glaseri* und *C. elegans* betrug 76 bzw. 80%. Die Distanzen waren für beide Methoden ähnlich, die Reproduzierbarkeit bei der ISSR-PCR-Methode jedoch deutlich besser. Die Verwandtschaftsverhältnisse wurden in Form von Dendrogrammen veranschaulicht.

Innerhalb der Arten waren die Distanzen bei der ISSR-PCR-Analyse für *H. bacteriophora* (13 Stämme) etwa 48%, bei *H. megidis* (4 Stämme) etwa 11% und bei *S. glaseri* (3 Stämme) 31%. Bei den im Kaiserstuhl (Süddeutschland) aus Larven des Feldmaikäfers isolierten Nematoden handelte es sich um zwei deutlich unterscheidbare Stämme bzw. Genotypen der Art *H. bacteriophora*. Bei dem *Steinernema*-Stamm aus Marokko scheint es sich um eine eigene Art zu handeln, die mit *S. arenaria* und *S. feltiae* näher verwandt ist als mit *S. glaseri*.

Die 20 Inzuchtlinien des *H. bacteriophora*-Hybridstammes PS7 hatten eine durchschnittliche Distanz von 19%. Ein Zusammenhang zwischen der Distanz einzelner Inzuchtlinien und deren Infektiosität bzw. Penetrationsaktivität bei Larven des Mehlkäfers (*Tenebrio molitor*) war nicht zu erkennen. Die Distanz zwischen dem Ausgangsstamm der Selektion und der Selektionslinie betrug bei *H. bacteriophora* 23% und bei *S. glaseri* 26%. Genetische Veränderungen während der Selektion waren also nachweisbar. Die Distanz zwischen dem applizierten, kommerziell produzierten Ausgangsstamm von *H. bacteriophora* (E-Nema, Raisdorf, Deutschland) und drei seiner von verschiedenen Standorten re-isolierten Linien betrug 35%. Diese größeren Distanzen bei den Re-Isolaten weisen auf einen höheren Selektionsdruck unter Freilandbedingungen hin. Die ISSR-PCR-Methode ist demnach dazu geeignet, geografische Stämme entomopathogener Nematoden als auch Inzuchtlinien, Selektionslinien bzw. Re-Isolate innerhalb eines Stammes zu unterscheiden.

Bei den sequenzierten ISSR-PCR-Produkten waren keine codierenden DNA-Abschnitte nachweisbar.

6. Summary

Entomopathogenic nematodes of the genera *Heterorhabditis* and *Steinernema* are commonly used in biological control of soil-dwelling pest insects. The infective juveniles (dauerlarvae) of these nematodes carry insect pathogenic symbiotic bacteria in their alimentary tract.

The work presented here investigates the biology of infection and the work conditions of these nematodes for larvae (white grubs) of the cockchafer (*Melolontha melolontha* and *M. hippocastani*) and the June Beetle (*Amphimallon solstitialis*). Various nematode species and strains were tested and for two species the possibility of selection-based improvement of their efficiency was investigated.

The species *S. glaseri* (USA) and a new *Steinernema*-isolate from Morocco exhibited the highest efficiency (60-85%) after application of 1.000 dauerlarvae per white grub. *Heterorhabditis* species and strains achieved only 5-25%. A pre-infection of the white grubs with rickettsia increased the efficiency about a factor of 3-6. The efficiency of both nematode species was higher in loamy soil than in sandy soil. The L2-stage of the white grubs was more susceptible than the L3-stage.

The infectivity of *H. bacteriophora* for larvae of the European Cockchafer could not be increased through selection via host passages, the assessed realised heritability was nearly zero. In contrast, the infectivity of *S. glaseri* could be increased through 10 host passages about the factor 9-15, the ascertained realised heritability was about 0.7. During selection the length of the dauerlarvae of *S. glaseri* increased by about 20%. The lipid content of these dauerlarvae was significantly increased.

The selection responses are explainable in terms of different invasion strategies. The probability of secondary penetration of dauerlarvae into the hemocoel of a white grub (after one dauerlarvae has already entered the hemocoel) is for both nematode species much higher than the probability of a primary penetration (penetration of the first dauerlarvae). This difference was especially distinct for *H. bacteriophora*. This species enters a white grub less effectively. Only few dauerlarvae penetrate, but already 1-3 in the hemocoel are sufficient to kill the white grub through the highly virulent symbiotic bacteria ("single fight strategy"). Proposed causes for the absence of positive selection responses and the high fluctuations of the efficiency are the low survival rate of primary penetrated dauerlarvae and further exo- and endogenous factors.

In *S. glaseri* a higher number of dauerlarvae penetrates and the survival rate of those primarily penetrated dauerlarvae is higher. The virulence of the symbiotic bacteria is low, so that at

least 15-50 dauerlarvae must invade in order to kill the white grub (“group strategy”). The selection pressure could successively be increased through reduction of the number of applied dauerlarvae.

To examine if the selected lines and re-isolated field released strains can be distinguished from their origin strains via molecular markers the methods of RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA – polymerase chain reaction) and ISSR-PCR (inter simple sequence repeats) were applied. The average of the ascertained genetic distances between the species *H. bacteriophora*, *H. marelatus*, *H. megidis*, *S. arenaria*, *S. feltiae*, *S. glaseri* and *C. elegans* was 76% and 80%, respectively. Both methods yielded similar distances but reproducibility was clearly better for the ISSR-PCR. The relationships were visualized by constructing dendrograms.

Based on ISSR-PCR the mean genetic distances within species were 48% for *H. bacteriophora* (13 strains), 11% for *H. megidis* (4 strains) and 31% for *S. glaseri* (3 strains). The nematodes that had been isolated from white grubs of the European Cockchafer in the area of the Kaiserstuhl (southern part of Germany) could be classified as two clearly distinguishable “genotypes” (strains) of *H. bacteriophora*. The *Steinernema* isolate from Morocco seems to be a new species, which is closer related to *S. arenaria* and *S. feltiae* than to *S. glaseri*.

The mean genetic distance between the 20 inbred lines from the *H. bacteriophora* hybrid “PS7” was 19%. The genetic distance between single inbred lines was not correlated with infectivity or penetration activity of the nematodes into larvae of the Meal Beetle (*Tenebrio molitor*).

The distance between the original strain of the selection and the selected lines for *H. bacteriophora* and *S. glaseri* was 23% and 26%, respectively. This testified to changes in the genotype during selection. The distance between the original field-released commercially produced hybrid of *H. bacteriophora* (E-Nema, Raisdorf, Germany) and three of its re-isolated lines from different localities was 35%. These higher distances of the re-isolates points to a higher selection pressure under field conditions. The ISSR-PCR-method allows to discriminate geographic strains of entomopathogenic nematodes and even inbred-lines, selection-lines and re-isolates within a strain.

None of the sequenced ISSR-PCR products represented coding DNA regions.

7. Literatur

- Abbott, W.S. (1925): A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Economic Entomology* 18: 265-267.
- AbuHatab, M., Selvan, S., Gaugler, R. (1995): Role of proteases in penetration of insect gut by the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae). *J. Invertebr. Pathol.* 66, 125-130.
- Adams, B.J., Burnell, A.M., Powers, T.O. (1998): A phylogenetic analysis of *Heterorhabditis* (Nematoda: Rhabditidae) based on internal transcribed spacer 1 DNA sequence data. *Journal of Nematology* 30 (1), 22-39.
- Adams, B.J. (2001): Species concepts and entomopathogenic nematodes: what species are, how we can find them, and an application to the genus *Heterorhabditis*. In Griffin, C.T., Burnell, A.M., Downes, M.J., Mulder, R. (eds.): *Developments in entomopathogenic nematode/bacterial research*, Europ. Comm. Publ. EUR 19696, Luxemburg, 30-35.
- Akhurst, R.J. (1980): Morphological and functional dimorphism in *Xenorhabdus* spp., bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and *Heterorhabditis*. *J. Gen. Microbiol.* 121, 303-309.
- Akhurst, R.J. (1983): Taxonomic study of *Xenorhabdus*, a genus of bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33 (1), 38-45.
- Akhurst, R.J. (1986): *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *poinarii*: its interaction with insect pathogenic nematodes. *System. Appl. Microbiol.* 8, 142-147.
- Akhurst, R.J., Bedding, R.A. (1978): A simple cross-breeding technique to facilitate species determination in the genus *Neoaplectana*. *Nematologica* 24, 328-330.
- Akhurst, R.J., Boemare, N.E. (1990): Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*. In Gaugler, R., Kaya, H.K. (eds.): *Entomopathogenic nematodes in Biological Control*, CRC Press, Boca Raton, Florida, ch. 4, 75-90.
- Alatorre-Rosas, R., Kaya, H.K. (1990): Interspecific competition between entomopathogenic nematodes in the genera *Heterorhabditis* and *Steinernema* for an insect host in sand. *J. Invertebr. Pathol.* 55, 179-188.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990): „Basic local alignment search tool.“ *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410.
- Ammiraju, J.S.S., Dholakia, B.B., Santra, D.K., Singh, H., Lagu, M.D., Tamhankar, S.A., Dhaliwal, H.S., Rao, V.S., Gupta, V.S., Ranjekar, P.K. (2001): Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 102: 726-732.
- Anderson, R.M. (1978a): Experimental studies of infection dynamics: infection of the definitive host by the cercariae of *Transversotrema patialense*. *Parasitology* 77, 189-200.
- Anderson, R.M. (1978b): Population dynamics of snail infection by miracidia. *Parasitology* 77, 201-224.
- Artyukhovskiy, A.K. (1967): *Neoaplectana arenaria* nov. sp. (Steinernematidae, Nematoda) – agent of a nematode disease in the May beetle in the Voronez province. *Trudy Voronezh Gosudarstvennogo Zapovednia* 15, 94-100. (in Russisch)
- Ayyadevara, S., Ayyadevara, R., Hou, S., Thaden, J.J., Shmookler Reis, R.J. (2001): Genetic mapping of quantitative trait loci governing longevity of *Caenorhabditis elegans* in recombinant-inbred progeny of a Bergerac-BO x RC301 interstrain cross. *Genetics* 157, 655-666.
- Barbercheck, M.E., Kaya, H.K. (1990): Interactions between *Beauveria bassiana* and the entomogenous nematodes, *Steinernema feltiae* and *Heterorhabditis heliothidis*. *J. Invertebr. Pathol.* 55, 225-234.

- Bedding, R.A., Akhurst, R.J. (1975): A simple technique for the detection of insect parasitic rhabditid nematodes in soil. *Nematologica* 21, 109-116.
- Bedding, R.A. (1981): Low cost in vitro mass production of *Neoplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. *Nematologica* 27, 109-114.
- Bedding, R.A., Molyneux, A.S. (1982): Penetration of insect cuticle by infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. (Heterorhabditidae: Nematoda). *Nematologica* 28, 354-359.
- Bedding, R.A. (1984): Large scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes *Neoplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. *Ann. Appl. Biol.* 104, 117-120.
- Bednarek, A. (1986): Development of the *Steinernema feltiae* (Filipjev) entomogenous nematode (*Steinernematidae*) in the conditions of occurrence in the insect's body cavity of other pathogens. *Annals of Warsaw Agricultural University – SGGW-AR, Animal Science* 20, 69-74.
- Begon, M., Harper, J.-L., Townsend, C.R. (1991): *Ökologie – Individuen, Populationen, Lebensgemeinschaften.* Birkhäuser-Verlag, Basel. (engl. Original-Ausgabe (1990): *Ecology – Individuals, Populations, Communities.* Second Edition, Blackwell Scientific Publ.s, Oxford.)
- Bellows, T.S. Jr. (1981): The descriptive properties of some models for density dependence. *Journal of Animal Ecology* 50, 139-156.
- Berner, M. (1997): Untersuchungen zur Infektionsbiologie von *Bacillus popilliae* und entomopathogenen Nematoden bei Engerlingen. Staatsexamensarbeit an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg. (unveröffentlicht)
- Berner, M., Ehlers, R.-U., Schnetter, W. (2001): Genetic variability and discrimination of isolates, inbred lines and hybrids of *Heterorhabditis bacteriophora* via RAPD-PCR. SIP 34th Annual Meeting Noordwijkerhout, The Netherlands, August 25-30, Program and Abstracts, ABS7.
- Berner, M. & Schnetter, W. (2001): Influence of repeated host-passages on the virulence and offspring production of *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema glaseri* against white grubs of the cockchafer *Melolontha melolontha*. In Griffin, C.T., Burnell, A.M., Downes, M.J., Mulder, R. (eds.): *Developments in entomopathogenic nematode/bacterial research*, Europ. Comm. Publ. EUR 19696, Luxemburg, 298.
- Berner, M. & Schnetter, W. (2001): Wirksamkeit entomopathogener Nematoden gegen Engerlinge der Maikäfer (*Melolontha melolontha* und *M. hippocastani*). *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent.* 13, 165-167.
- Berner, M. & Schnetter, W. (2002a): Field trials with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* against white grubs of the European cockchafer (*Melolontha melolontha*) in the southern part of Germany. *IOBC wprs Bulletin* 25 (7), 29-34.
- Berner, M. & Schnetter, W. (2002b): Application of ISSR-PCR to characterise entomopathogenic nematodes within a selection program for higher efficiency against white grubs of the cockchafer (*Melolontha* spp.). *IOBC wprs Bulletin* 25 (7), 35-40.
- Berner, M. & Schnetter, W. (2002c): Nematoden zur Bekämpfung von Maikäfer-Engerlingen. *Laimburg Journal* 1 (2), in press.
- Bigler, F. (1989): Quality assessment and control in entomophagous insects used for biological control. *J. Appl. Entomol.* 108, 390-400.
- Blackburn, M., Golubeva, E., Bowen, D., French-Constant (1998): A novel insecticidal toxin from *Photorhabdus luminescens*, toxin complex a (Tca), and its histopathological effects on the midgut of *Manduca sexta*. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (8), 3036-3041.
- Blaxter, M.L., De Ley, P., Garey, J.R., Liu, L.X., Scheldeman, P., Vierstraete, A., Vanfleteren, J.R., Mackay, L.Y., Dorris, M., Frisse, L.M., Vida, J.T., Thomas, W.K. (1998): A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature* 392, 71-75.

- Bliss, C.I. (1953): Fitting the negative binomial distribution to biological data and note on the efficient fitting of the negative binomial. *Biometrics* 9, 176-200.
- Boemare, N.E., Akhurst, R.J. (1988): Biochemical and physiological characterization of colony form variants in *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae). *J. Gen. Microbiol.* 134, 751-761.
- Boemare, N.E., Akhurst, R.J., Mourant, R.G. (1993). DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of the entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43, 249-255.
- Boemare, N. (2001): Co-speciation between *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* symbionts and their nematode hosts. In Griffin, C.T., Burnell, A.M., Downes, M.J., Mulder, R. (eds.): *Developments in entomopathogenic nematode/bacterial research*, Europ. Comm. Publ. EUR 19696, Luxembourg, 13-17.
- Boff, M.I.C. (2001): The entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis*: host searching behaviour, infectivity and reproduction. PhD Thesis Wageningen University.
- Bohan, D.A., Hominick, W.M. (1995): Investigations on the presence of an infectious proportion amongst populations of *Steinernema feltiae* (Site 76 strain) infective stages. *Parasitology* 112, 113-118.
- Bohan, D.A., Hominick, W.M. (1997a): Long-term dynamics of infectiousness within the infective-stage pool of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Site 76 strain) Filipjev. *Parasitology* 114, 301-308.
- Bohan, D.A., Hominick, W.M. (1997b): Sex and the dynamics of infection in the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. *Journal of Helminthology* 71, 197-201.
- Bowen, D., Rocheleau, T.A., Blackburn, M., Andreev, O., Golubeva, E., Bhartia, R., French-Constant, R.H. (1998): Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*. *Science* 280, 2129-2132.
- Burnell, A.M., Dowds, B.C.A. (1996): The genetic improvement of entomopathogenic nematodes and their symbiont bacteria: phenotypic targets, genetic limitations and assessment of possible hazards. *Biocontrol Science and Technology* 6, 435-447.
- Burnell, A.M. (2001): EPN genetics: Current status and future developments. In Griffin, C.T., Burnell, A.M., Downes, M.J., Mulder, R. (eds.): *Developments in entomopathogenic nematode/bacterial research*, Europ. Comm. Publ. EUR 19696, Luxembourg, 206-211.
- Campbell, J., Orza, G., Yoder, F., Lewis, E., Gaugler, R. (1998): Spatial and temporal distribution of endemic and released entomopathogenic nematode populations in turfgrass. *Entomologia experimentalis et applicata* 86, 1-11.
- Campbell, J.F., Koppenhöfer, A.M., Kaya, H.K., Chinnasri, B. (1999): Are there temporarily non-infectious dauer stages in entomopathogenic nematode populations: a test of the phased infectivity hypothesis. *Parasitology* 118, 499-508.
- Cekic, C., Battey, N.H., Wilkinson, M.J. (2001): The potential of ISSR-PCR primer-pair combinations for genetic linkage analysis using the seasonal flowering locus in *Fragaria* as a model. *Theor. Appl. Genet.* 103, 540-546.
- Curran, J., Baillie, D.L., Webster, J.M. (1985): Use of genomic DNA restriction length differences to identify nematode species. *Parasitology* 90, 137-144.
- Curtsinger, J.W. (1986): Quantitative wing variation in inbred and outbred lines of *Drosophila melanogaster*. *The Journal of Heredity* 77, 267-271.
- Dix, I., Burnell, A. (2001): Reproductive incompatibility among *Heterorhabditis* isolates showing the same rDNA ITS restriction profile. In Griffin, C.T., Burnell, A.M., Downes, M.J., Mulder, R. (eds.): *Developments in entomopathogenic nematode/bacterial research*, Europ. Comm. Publ. EUR 19696, Luxembourg, 54-61.
- Druett, H.A. (1952): Bacterial invasion. *Nature* 170, 288.

- Dunphy, G.B., Webster, J.M. (1989): The monoxenic culture of *Neoaplectana carpocapsae* DD-136 and *Heterorhabditis heliothidis*. *Revue Nematol.* 12 (2), 113-123.
- Dunphy, G.B., Thurston, G.S. (1990): Insect immunity. In Gaugler, R., Kaya, H.K. (eds.): *Entomopathogenic nematodes in Biological Control*, CRC Press, Boca Raton, Florida, ch. 16, 301-323.
- Ehlers, D., Beetz, S. (1998): Activation of the phenoloxidase system and its relation to the recognition of foreign material. In Simões, N., Boemare, N., Ehlers, R.-U. (eds.): *Pathogenicity of entomopathogenic nematodes versus insect defence mechanisms: impact on selection of virulent strains*, Europ. Comm. Publ. EUR 17776, Luxemburg, 123-133.
- Ehlers, R.-U., Stoessel, S., Wyss, U. (1990): The influence of phase variants of *Xenorhabdus* spp. and *Escherichia coli* (Enterobacteriaceae) on the propagation of entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis*. *Revue Nematol.* 13 (4), 417-424.
- Ehlers, R.-U., Peters, A. (1994): Entomopathogenic nematodes in biological control: feasibility, perspectives and possible risks. In "Biological Control – Benefits and Risks" (Hokkanen, H.M.T., Lynch, J.M., eds.), Cambridge University Press, Cambridge, 119-136.
- Ehlers, R.-U., Peters, A. (1998): Bekämpfung von Engerlingen auf Sportrasen. *Rasen* 29, 60-67.
- Ehlers, R.-U., Niemann, I., Hollmer, S., Strauch, O., Jende, D., Shanmugasundaram, M., Mehta, U.K., Easwaramoorthy, S.K., Burnell, A. (2000): Mass production potential of the bacto-helminthic biocontrol complex *Heterorhabditis indica-Photorhabdus luminescens*. *Biocontrol Science and Technology* 10, 607-616.
- Ehlers, R.-U. (2001): Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 623-633.
- Falconer, D.S. (1952): The problem of environment and selection. *The American Naturalist* 86 (830), 293-298.
- Falconer, D.S. & Mackay, T.F.C. (1996): *Introduction to Quantitative Genetics*. Fourth Edition, Longman Group Ltd, Malaysia.
- Fan, X., Hominick, W.M. (1991): Effects of low storage temperature on survival and infectivity of two *Steinernema* species (Nematoda: Steinernematidae). *Revue Nématol.* 14, 407-412.
- Fang, D.Q., Roose, M.L., Krueger, R.R., Federici, C.T. (1997): Fingerprinting trifoliolate orange germ plasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95, 211-219.
- Fang, D.Q., Roose, M.L. (1997): Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95, 408-417.
- Fang, D.Q., Roose, M.L. (1999): Inheritance of intersimple sequence repeat markers in citrus. *J. Hered.* 90, 247-249.
- Felsenstein, J. (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39 (4), 783-791.
- Ferron, P., Hurpin, B., Robert, P.H. (1969): Sensibilisation des larves de *Melolontha melolontha* L. a la mycose a *Beauveria tenella* par une infection prealable. *Entomophaga* 14 (4), 429-437.
- French-Constant, R., Bowen, D. (1999): *Photorhabdus* toxins: novel biological insecticides. *Current Opinion in Microbiology* 2, 284-288.
- Filipjev, I.N. (1934): *Miscellanea Nematologica* 1. Eine neue Art der Gattung *Neoaplectana* Steiner nebst Bemerkungen über die systematische Stellung der letzteren. *Mag. Parasitol. Institut. Zool. Acad. USSR* 4, 229-240.
- Finney, D.J. (1971): *Probit Analysis*. Third Edition, Cambridge Univ. Press, London.

- Fitters, P.F., Patel, M.N., Griffin, C.T., Wright, D.J. (1999): Fatty acid composition of *Heterorhabditis* sp. during storage. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem Mol. Biol.* 124 (1), 81-88.
- Fodor, A., Vecseri, G., Farkas, T. (1990): *Caenorhabditis elegans* as a model for the study of entomopathogenic nematodes. In Gaugler, R., Kaya, H.K. (eds.): *Entomopathogenic nematodes in Biological Control*, CRC Press, Boca Raton, Florida, ch. 13, 249-269.
- Fodor, A. (2001): Technology transfer of research methodology from *C. elegans* to EPN. In Griffin, C.T., Burnell, A.M., Downes, M.J., Mulder, R. (eds.): *Developments in entomopathogenic nematode/bacterial research*, Europ. Comm. Publ. EUR 19696, Luxemburg, 212-227.
- Forschler, B.T., Gardner, W.A. (1991): Parasitism of *Phyllophaga hirticula* (Coleoptera: Scarabaeidae) by *Heterorhabditis heliothidis* and *Steinernema carpocapsae*. *J. Invertebr. Pathol.* 58, 396-407.
- Fournier, P.E., Roux, V., Raoult, D. (1998): Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 (3), 839-849.
- Gaugler, R. (1988): Ecological considerations in the biological control of soil-inhabiting insects with entomopathogenic nematodes. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 24, 351-360.
- Gaugler, R., Campbell, J.F., McGuire, T.R. (1989a): Selection for host-finding in *Steinernema feltiae*. *J. Invertebr. Pathol.* 54, 363-372.
- Gaugler, R., McGuire, T., Campbell, J. (1989b): Genetic variability among strains of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae*. *Journal of Nematology* 21 (2), 247-253.
- Gaugler, R., Campbell, J.F., McGuire, T.R. (1990): Fitness of a genetically improved entomopathogenic nematode. *J. Invert. Pathol.* 56, 106-116.
- Gaugler, R., Campbell, J.F. (1991): Selection for enhanced host-finding of scarab larvae (Coleoptera: Scarabaeidae) in an entomopathogenic nematode. *Environmental Entomology* 20 (2), 700-706.
- Gaugler, R., Campbell, J.F., Gupta, P. (1991): Characterization and basis of enhanced host finding in a genetically improved strain of *Steinernema carpocapsae*. *J. Invertebr. Pathol.* 57, 234-241.
- Gaugler, R., Glazer, I., Campbell, J.F., Liran, N. (1994): Laboratory and field evaluation of an entomopathogenic nematode genetically selected for improved host-finding. *J. Invertebr. Pathol.* 63, 68-73.
- Gaugler, R., Lewis, E., Stuart, R.J. (1997): Ecology in the service of biological control: the case of entomopathogenic nematodes. *Oecologia* 109, 483-489.
- Gaugler, R., Hashmi, S. (1998): Genetic improvement of entomopathogenic nematodes. *Proc. VIIth Int. Colloq. on Invert. Pathol. and Microb. Control*, Sapporo, 45-48.
- Gilbert, J.E., Lewis, R.V., Wilkinson, M.J., Caligari, P.D.S. (1999): Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theor. Appl. Genet.* 98, 1125-1131.
- Gisi, U., Schenker, R., Schulin, R., Stadelmann, F.X., Sticher, H. (1997): *Bodenökologie*. 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart/New York.
- Glare, T.R., Jackson, T.A., Zimmermann, G. (1993): Occurrence of *Bacillus popilliae* and two nematode pathogens in populations of *Amphimallon solstitialis* (Col.: Scarabaeidae) near Darmstadt, Germany. *Entomophaga* 38 (4), 441-450.
- Glazer, I., Gaugler, R., Segal, D. (1991): Genetics of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP88: the diversity of beneficial traits. *Journal of Nematology* 23 (3), 324-333.
- Glazer, I., Salame, L., Segal, D. (1997): Genetic enhancement of nematicide resistance in entomopathogenic nematodes. *Biocontrol Science and Technology* 7, 499-512.

- Glazer, I., Segal, D. (2001): Advances in molecular and biochemical analysis of stress tolerance in entomopathogenic nematodes. In Griffin, C.T., Burnell, A.M., Downes, M.J., Mulder, R. (eds.): Developments in entomopathogenic nematode/bacterial research, Europ. Comm. Publ. EUR 19696, Luxemburg, 238-242.
- Godwin, I.D., Aitken, E.A.B., Smith, L.W. (1997): Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis* 18, 1524-1528.
- Götz, P., Boman, A., Boman, H.G. (1981): Interaction between insect immunity and an insect-pathogenic nematode with symbiotic bacteria. *Proc. R. Soc. Lond. B* 212, 333-350.
- Götz, P. (1988): Immunologie: Immunreaktionen bei Wirbellosen, insbesondere Insekten. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 81, 113-129.
- Gopal, J. (1999): In vitro versus in vivo genetic divergence in potato. *Theor. Appl. Genet.* 98, 299-304.
- Graustein, A., Gaspar, J.M., Walters, J.R., Palopoli, M.F. (2002): Levels of DNA polymorphism vary with mating system in the nematode genus *Caenorhabditis*. *Genetics* 161, 99-107.
- Grenier, E., Laumond, C., Abad, P. (1996): Molecular characterization of two species-specific tandemly repeated DNAs from entomopathogenic nematodes *Steinernema* and *Heterorhabditis* (Nematoda: Rhabditida). *Molecular and Biochemical Parasitology* 83, 47-56.
- Grenier, E., Catzeflis, F.M., Abad, P. (1997): Genome sizes of the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* (Nematoda: Rhabditida). *Parasitology* 114, 497-501.
- Grewal, P.S., Gaugler, R., Lewis, E.E. (1993): Host recognition behavior by entomopathogenic nematodes during contact with insect gut contents. *J. Parasitol.* 79 (4), 495-503.
- Grewal, P.S., Lewis, E.E., Gaugler, R., Campbell, J.F. (1994): Host finding behaviour as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. *Parasitology* 108, 207-215.
- Griffin, C.T., Simons, W.R., Smits, P.H. (1989): Activity and infectivity of four isolates of *Heterorhabditis* spp. *J. Invertebr. Pathol.* 53, 107-112.
- Griffin, C.T., Downes, M.J. (1994): Selection of *Heterorhabditis* sp. for improved infectivity at low temperatures. In Burnell, A.M., Ehlers, R.-U., Masson, J.P. (eds.): Genetics of Entomopathogenic Nematode-Bacterium Complexes. Europ. Comm. Publ. EUR 15681, Luxemburg, 143-151.
- Griffin, C.T. (1996): Effects of prior storage conditions on the infectivity of *Heterorhabditis* sp. (Nematoda: Heterorhabditidae). *Fundam. Appl. Nematol.* 19 (1), 95-102.
- Griffin, C.T., O'Callaghan, K.M., Dix, I. (2001): Hermaphroditism in *Steinernema*: Ecological advantage and implications for species identification. In Griffin, C.T., Burnell, A.M., Downes, M.J., Mulder, R. (eds.): Developments in entomopathogenic nematode/bacterial research, Europ. Comm. Publ. EUR 19696, Luxemburg, 62-66.
- Han, R., Ehlers, R.-U. (2001): Effect of *Photorhabdus luminescens* phase variants on the in vivo and in vitro development and reproduction of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. *Microbiol. Ecol.* 35 (3), 239-247.
- Hashmi, G., Glazer, I., Gaugler, R. (1996): Molecular comparisons of entomopathogenic nematodes using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Fund. appl. Nematol.* 19 (4), 399-406.
- Hashmi, G., Gaugler, R. (1998): Genetic Diversity in insect-parasitic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae). *J. Invertebr. Pathol.* 72, 185-189.
- Hashmi, S., Hashmi, G., Glazer, I., Gaugler, R. (1998): Thermal response of *Heterorhabditis bacteriophora* transformed with the *Caenorhabditis elegans* hsp70 encoding gene. *The Journal of Experimental Zoology* 281, 164-170.

- Hastings, I.M. (1994): Introduction to quantitative genetics: inbreeding, heritability estimates and artificial selection. In Burnell, A.M., Ehlers, R.-U., Masson, J.P. (eds.): Genetics of Entomopathogenic Nematode-Bacterium Complexes. Europ. Comm. Publ. EUR 15681, Luxemburg, 143-151.
- Hatab, M.A., Gaugler, R., Ehlers, R.-U. (1998): Influence of culture method on *Steinernema glaseri* lipids. J. Parasitol. 84 (2), 215-221.
- Hay, D.B., Fenlon, J.S. (1995): A modified binomial model that describes the infection dynamics of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* (Steinernematidae; Nematoda). Parasitology 111, 627-633.
- Hazel, L.N., Lush, J.L. (1942): The efficiency of three methods of selection. Journal of Heredity 33 (1), 393-399.
- Hernández, P., Martín, A., Dorado, G. (1999): Development of SCARs by direct sequencing of RAPD products: a practical tool for the introgression and marker-assisted selection of wheat. Molecular Breeding 5, 245-253.
- Hernández, P., de la Rosa, R., Rallo, L., Dorado, G., Martín, A. (2001): Development of SCAR markers in olive (*Olea europaea*) by direct sequencing of RAPD products: applications in olive germplasm evaluation and mapping. Theor. Appl. Genet. 103, 788-791.
- Hill, W.G. (1971): Design and efficiency of selection experiments for estimating genetic parameters. Biometrics 27, 293-311.
- Hill, W.G. (1972): Estimation of realised heritabilities from selection experiments. I Divergent selection, II. Selection in one direction. Biometrics 28, 747-780.
- Hominick, W.M., Briscoe, B.R. (1990a): Survey of 15 sites over 28 months for entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). Parasitology 100, 289-294.
- Hominick, W.M., Briscoe, B.R. (1990b): Occurrence of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae). Parasitology 100, 295-302.
- Hominick, W.M., Briscoe, B.R., del Pino, F.G., Heng, J., Hunt, D.J., Kozodoy, E., Mracek, Z., Nguyen, K.B., Reid, A.P., Spiridonov, S., Stock, P., Sturhan, D., Waturu, C., Yoshida, M. (1997): Biosystematics of entomopathogenic nematodes: current status, protocols and definitions. Journal of Helminthology 71, 271-298.
- Hominick, W.M., Reid, A.P., Hunt, D.J., Briscoe, B.R. (2001): Systematics and biogeography of entomopathogenic nematodes. In Griffin, C.T., Burnell, A.M., Downes, M.J., Mulder, R. (eds.): Developments in entomopathogenic nematode/bacterial research, Europ. Comm. Publ. EUR 19696, Luxemburg, 18-29.
- Houle, D. (1992): Comparing evolvability and variability of quantitative traits. Genetics 130, 195-204.
- Hoy, M.A. (1986): Use of genetic improvement in biological control. Agriculture, Ecosystems and Environment 15, 109-119.
- Huang, J.C., Sun, M. (2000): Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea* series Batatas (Convolvulaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. Theor. Appl. Genet. 100, 1050-1060.
- Huber, J., Hughes, P.R. (1984): Quantitative Bioassay in Insect Pathology. Bulletin of the Entomological Society of America 30, 31-34.
- Hurpin, B., Robert, P. (1968): Experiments on simultaneous infection of the common cockchafer, *Melolontha melolontha*. J. Invertebr. Pathol. 11, 203-213.
- Ishibashi, N., Kondo, E. (1990): Behavior of infective juveniles. In Gaugler, R., Kaya, H.K. (eds.): Entomopathogenic nematodes in Biological Control, CRC Press, Boca Raton, Florida, ch. 7, 139-150.
- Jackson, T.A., Glare, T.R. (1992): Rickettsial diseases of scarabs. In "Use of pathogens in scarab pest management" (Glare, T.R., Jackson, T.A, eds.), Intercept, Anover, ch. 4, 33-42.

- James, J.W. (1962): Response curves in selection experiments. *Heredity* 20, 57-63.
- Jiang, H., Wang, Y., Kanost, M.R. (1998): Pro-phenol oxidase activating proteinase from an insect, *Manduca sexta*: A bacteria-inducible protein similar to *Drosophila* easter. *Biochemistry* 95, 12220-12225.
- Johnigk, S.-A., Ehlers, R.-U. (1999a): Juvenile development and life cycle of *Heterorhabditis bacteriophora* and *H. indica* (Nematoda: Heterorhabditidae). *Nematology* 1 (3), 251-260.
- Johnigk, S.-A., Ehlers, R.-U. (1999b): *Endotokia matricida* in hermaphrodites of *Heterorhabditis* spp. and the effect of the food supply. *Nematology* 1 (7-8), 717-726.
- Johnigk, S.A., Hollmer, S., Strauch, O., Wyss, U., Ehlers, R.-U. (2002): Heritability of the liquid culture mass production potential of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora*. *Biocontrol Science and Technology* 12, 267-276.
- Johnson, T.E., Wood, W.B. (1982): Genetic analysis of life-span in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, 6603-6607.
- Jones, J., Blok, V., Popeijus, H., Prior, A., Phillips, M., Smant, G. (2001): ESTs (expressed sequence tags) and parasitism – sequences and function. In Griffin, C.T., Burnell, A.M., Downes, M.J., Mulder, R. (eds.): *Developments in entomopathogenic nematode/bacterial research*, Europ. Comm. Publ. EUR 19696, Luxemburg, 228-237.
- Jones, C.J., Edwards, K.J., Castaglione, S., Winfield, M.O., Sala, F., van de Wiel, C., Bredemeijer, G., Vosman, B., Matthes, M., Daly, A., Brettschneider, R., Bettini, P., Buiatti, M., Maestri, E., Malcevski, A., Marmiroli, N., Aert, R., Volckaert, G., Rueda, J., Linacero, R., Vazquez, A., Karp, A. (1997): Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding* 3, 381-390.
- Joyce, S.A., Burnell, A.M., Powers, T.O. (1994): Characterization of *Heterorhabditis* isolates by PCR amplification of segments of mtDNA and rDNA genes. *Journal of Nematology* 26 (3), 260-270.
- Jung, K. (1999): Qualität insektenpathogener Nematoden (Heterorhabditidae: Nematoda) – Identifikation und Quantifizierung qualitätsbestimmender Eigenschaften sowie deren Beeinflussung durch ausgewählte abiotische Faktoren während der Lagerung. Dissertation an der Technischen Universität Darmstadt.
- Kaya, H.K., Burlando, T.M. (1989): Development of *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) in diseased insect hosts. *J. Invertebr. Pathol.* 53, 164-168.
- Kaya, H.K. (1990): Soil ecology. In Gaugler, R., Kaya, H.K. (eds.): *Entomopathogenic nematodes in Biological Control*, CRC Press, Boca Raton, Florida, ch. 5, 93-115.
- Kleespies, R., Bathon, H., Zimmermann, G. (1989): Untersuchungen zum natürlichen Vorkommen von entomopathogenen Pilzen und Nematoden in verschiedenen Böden in der Umgebung von Darmstadt. *Gesunde Pflanzen*, 41 (10), 350-354.
- Knaap, E., Rodriguez, R.J., Freckman, D.W. (1993): Differentiation of bacterial-feeding nematodes in soil ecological studies by means of arbitrarily-primed PCR. *Soil Biol. Biochem.* 25 (9), 1141-1151.
- Knight, C.G., Azevedo, R.B.R., Leroi, A.M. (2001): Testing life-history pleiotropy in *Caenorhabditis elegans*. *Evolution* 55 (9), 1795-1804.
- Köhler, W., Schachtel, G., Voleske, P. (1996): *Biostatistik*. 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Koppenhöfer, A.M., Kaya, H.K. (1997): Additive and synergistic interaction between entomopathogenic nematodes and *Bacillus thuringiensis* for scarab grub control. *Biological Control* 8, 131-137.
- Kozodoi, E.M. (1984): [A new entomophagous nematode *Neoaplectana anomali* sp. n. (Rhabditida: Steinernematidae) and its biology]. *Zoologicheskii Zhurnal* 63, 1605-1909 (in Russisch).
- Kramer, I. (2000): Estimation of errors in nematode counts from suspensions. *IOBC wprs Bulletin* 23 (2), 105-108.

- Kramer, I., Hirschy, O., Grunder, M. (2001): Survey of baited insect parasitic nematodes from the Swiss lowland. In Griffin, C.T., Burnell, A.M., Downes, M.J., Mulder, R. (eds.): Developments in entomopathogenic nematode/bacterial research, Europ. Comm. Publ. EUR 19696, Luxemburg, 178-182.
- Krasomil-Osterfeld, K. (1993): Charakterisierung von Phasenvarianten des symbiotischen Begleitbakteriums *Xenorhabdus luminescens* (XSH1) und ihr Einfluss auf die Vermehrung des entomopathogenen Nematoden *Heterorhabditis* sp. (HSH1) in monoxenischer Flüssigkultur. Dissertation am Institut für Phytopathologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Krawczak, M., Schmidtke, J. (1994): DNA-Fingerprinting. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin/Oxford.
- Krieg, A. (1971): Possible use of rickettsia for microbial control of insects. In "Microbial Control of Insects and Mites" (Burgess, H.D., Hussey, N.W., eds.). Academic Press, London, ch. 7, 173-179.
- Lefebvre, V., Goffinet, B., Chauvet, J.C., Caromel, B., Signoret, P., Brand, R., Palloix, A. (2001): Evaluation of genetic distances between pepper inbred lines for cultivar protection purposes: comparison of AFLP, RAPD and phenotypic data. *Theor. Appl. Genet.* 102, 741-750.
- Leroy, X.J., Leon, K., Hily, J.M., Chaumeil, P., Branchard, M. (2001): Detection of *in vitro* culture-induced instability through inter-simple sequence repeat analysis. *Theor. Appl. Genet.* 102, 885-891.
- Lewis, E.E., Gaugler, R., Harrison, R. (1992): Entomopathogenic nematode host finding: response to host contact cues by cruise and ambush foragers. *Parasitology* 105, 309-315.
- Lewis, E.E., Selvan, S., Campbell, J.F., Gaugler, R. (1995): Changes in foraging behaviour during the infective stage of entomopathogenic nematodes. *Parasitology* 110, 583-590.
- Liu, J., Berry, R.E. (1995): Differentiation of isolates in the genus *Steinernema* (Nematoda: Steinernematidae) by random amplified polymorphic DNA fragments and morphological characters. *Parasitology* 111, 119-125.
- Liu, J., Berry, R.E. (1995): Determination of PCR conditions for RAPD analysis in entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae and Steinernematidae). *J. Invertebr. Pathol.* 65, 79-81.
- Liu, J., Berry, R.E. (1996a): Phylogenetic analysis of the genus *Steinernema* by morphological characters and randomly amplified polymorphic DNA fragments. *Fundamental and Applied Nematology* 19, 463-469.
- Liu, J., Berry, R.E. (1996b): *Heterorhabditis marelatus* n. sp. (Rhabditida: Heterorhabditidae) from Oregon. *J. Invertebr. Pathol.* 67, 48-54.
- Liu, J., Berry, R.E., Moldenke, A.F. (1997): Phylogenetic relationships of entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) inferred from partial 18S rRNA gene sequences. *J. Invertebr. Pathol.* 69, 246-252.
- Liu, J., Berry, R.E., Blouin, M.S. (1999): Molecular differentiation and phylogeny of entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Heterorhabditidae) based on ND4 gene sequences of mitochondrial DNA. *J. Parasitol.* 85 (4), 709-715.
- Liu, J., Berry, R.E., Blouin, M.S. (2001): Identification of symbiotic bacteria (*Photorhabdus* and *Xenorhabdus*) from the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis marelatus* and *Steinernema oregonense* based on 16S rDNA sequence. *J. Invertebr. Pathol.* 77, 87-91.
- Lunau, S., Stoessel, S., Schmidt-Peisker, A. J., Ehlers, R.-U. (1993): Establishment of monoxenic inocula for scaling up *in vitro* cultures of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp. *Nematologica* 39, 385-399.
- Mamiya, Y. (1988): *Steinernema kushidai* n. sp. (Nematoda: Steinernematidae) associated with scarabaeid beetle larvae from Shizuoka, Japan. *Appl. Ent. Zool.* 23 (3), 313-320.
- Martin, R. (1996): Elektrophorese von Nucleinsäuren. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin/Oxford.

- Meinert, G., Glas, M., Frösche, M., Albert, R., Harmuth, P., Schmidt, K. (2001): Integrierte Pflanzenschutzmaßnahmen gegen den Feldmaikäfer (*Melolontha melolontha* L.) im Bereich des nördlichen Kaiserstuhls 1997. *Gesunde Pflanze* 53 (5), 148-157.
- Meyer, H.H., Enfield, F.D. (1975): Experimental evidence on limitations of the heritability parameter. *Theor. Appl. Genet.* 45, 268-273.
- Milstead, J.E. (1979): *Heterorhabditis bacteriophora* as a vector for introducing its associated bacterium into the hemocoel of *Galleria mellonella* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 33, 324-327.
- Mráček, Z., Hanzal, R., Kodrik D. (1988): Sites of penetration of juvenile Steinernematids and Heterorhabditids (Nematoda) into larvae of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *J. Invertebr. Pathol.* 52, 477-478.
- Müller, H.-J. (2001): Polymerasen Kettenreaktion (PCR) – Das Methodenbuch. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin.
- Nagaoka, T., Ogihara, Y. (1997): Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 94, 597-602.
- Nasmith, C.G., Speranzini, D., Jeng, R., Hubbes, M. (1996): RFLP analysis of PCR amplified ITS and 26S ribosomal RNA genes of selected entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology* 28 (1), 15-25.
- Navon, A., Alchanatis, V., Glazer, I., Salame, L., Levski, S. (2000): An image analysis of *Spodoptera littoralis* feeding behavior following ingestion of the insecticidal nematode *Steinernema riobrave* in an alginic gel carrier. *IOBC wprs Bulletin* 23 (2), 85-90.
- Nei, M., Li, W.H. (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* 74, 5267-5273.
- Newton, C.R., Graham, A. (1994): PCR. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg/Berlin/Oxford.
- Niklas, O.F. (1960): Standorteinflüsse und natürliche Feinde als Begrenzungsfaktoren von *Melolontha*-Larvenpopulationen eines Waldgebietes (Forstamt Lorsch, Hessen) (Coleoptera: Scarabaeidae). *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem* 101, 1-60.
- O'Leary, S., Stack, C.M., Chubb, M.A., Burnell, A.M. (1998): The effect of day of emergence from the insect cadaver on the behavior and environmental tolerances of infective juveniles of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* (Strain UK211). *J. Parasitol.* 84 (4), 665-672.
- Page, R.D.M. (1996): Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Applications Note* 12 (4), 357-358.
- Pamjav, H., Triga, D., Buzás, Z., Vellai, T., Lucskai, A., Adams, B., Reid, A.P., Burnell, A., Griffin, C., Glazer, I., Klein, M.G., Fodor, A., (1999): Novel application of PhastSystem polyacrylamide gel electrophoresis using restriction fragment length polymorphism – internal transcribed spacer patterns of individuals for molecular identification of entomopathogenic nematodes. *Electrophoresis* 20, 1266-1273.
- Patel, M.N., Wright, D.J. (1997): Glycogen: its importance in the infectivity of aged juveniles of *Steinernema carpocapsae*. *Parasitology* 114, 591-596.
- Patel, M.N., Stolinski, M., Wright, D.J. (1997): Neutral lipids and the assessment of infectivity in entomopathogenic nematodes: observations on four *Steinernema* species. *Parasitology* 114, 489-496.
- Peters, A. (1994): Interaktionen zwischen den Pathogenitätsmechanismen entomopathogener Nematoden und den Abwehrmechanismen von Schnakenlarven (*Tipula* spp.) sowie Möglichkeiten zur Virulenzsteigerung der Nematoden durch Selektion. Dissertation am Institut für Phytopathologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Peters, A. (1996): The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. *Biocontrol Science and Technology* 6, 389-402.

- Peters, A., Ehlers, R.-U. (1997): Encapsulation of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* in *Tipula oleracea*. J. Invertebr. Pathol. 69, 218-222.
- Peters, A. (2000a): Susceptibility of *Melolontha melolontha* to *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. megidis* and *Steinernema glaseri*. IOBC wprs Bulletin 23 (8), 39-45.
- Peters, A. (2000b): Insect based assays for entomopathogenic nematode infectiousness: definitions, guidelines, problems. IOBC wprs Bulletin 23 (2), 109-114.
- Peto, S. (1953): A dose-response equation for the invasion of micro-organisms. Biometrics 9, 320-335.
- Plattner, H., Zingsheim, H.-P. (1987): Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/NewYork.
- Poinar, G.O. Jr. (1976): Description and biology of a new insect parasitic rhabditoid, *Heterorhabditis bacteriophora* n. gen. n. sp. (Rhabditida; Heterorhabditida n. fam.). Nematologica 21, 463-470.
- Poinar, G.O. Jr., Kozodoi, E.M. (1988): *Neoplectana glaseri* and *N. anomali*: sibling species or parallelism? Revue Nématol. 11 (1), 13-19.
- Poinar, G.O. Jr., Jackson, T., Klein, M. (1987): *Heterorhabditis megidis* sp. n. (Heterorhabditidae: Rhabditida), parasitic in the Japanese beetle, *Popillia japonica* (Scarabaeidae: Coleoptera), in Ohio. Proc. Helminthol. Soc. Wash. 54, 53-59.
- Poinar, G.O. Jr. (1990): Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae. In Gaugler, R., Kaya, H.K. (eds.): Entomopathogenic nematodes in Biological Control, CRC Press, Boca Raton, Florida, ch. 2, 23-61.
- Poinar, Jr. G.O. (1992): Nematodes associated with Scarabaeidae. In "Use of pathogens in scarab pest management" (Glare, T.R., Jackson, T.A, eds.), Intercept, Anover, ch. 8, 93-109.
- Poinar, Jr. G.O. (1993): Origins and phylogenetic relationships of the entomophilic rhabditids, *Heterorhabditis* and *Steinernema*. Fundam. Appl. Nematol. 16 (4), 333-338.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski, A. (1996): The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding 2, 225-238.
- Prevost, A., Wilkinson, M.J. (1999): A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theor. Appl. Genet. 98, 107-112.
- Ratnaparkhe, M.B., Tekeoglu, M., Muehlbauer, F.J. (1998): Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. Theor. Appl. Genet. 97, 515-519.
- Reddy, K.D., Nagaraju, J., Abraham, E.G. (1999): Genetic characterization of the silkworm *Bombyx mori* by simple sequence repeat (SSR)-anchored PCR. Heredity 83, 681-687.
- Reid, A.P., Hominick, W.M. (1992): Restriction fragment length polymorphisms within the ribosomal DNA repeat unit of British entomopathogenic nematodes (Rhabditida: Steinernematidae). Parasitology 105, 317-323.
- Reid, A.P., Hominick, W.M. (1993): Cloning of the rDNA repeat unit from a British entomopathogenic nematode (Steinernematidae) and its potential for species identification. Parasitology 107, 529-536.
- Ricci, M., Glazer, I., Campbell, J.F., Gaugler, R. (1996): Comparison of Bioassays to Measure Virulence of Different Entomopathogenic Nematodes. Biocontrol Science and Technology 6, 235-245.
- Richardson, P.N. (2001): The use of entomopathogenic nematodes to control insect pests in mushroom production. In Griffin, C.T., Burnell, A.M., Downes, M.J., Mulder, R. (eds.): Developments in entomopathogenic nematode/bacterial research, Europ. Comm. Publ. EUR 19696, Luxemburg, 93-96.

- Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., Priess, J.R. (1997): Introduction to *C. elegans*. In Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., Priess, J.R. (eds.): *C. elegans* II. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1-22.
- Robertson, A. (1960): A theory of limits in artificial selection. *Proc. Roy. Soc.* 153, 234-249.
- Rus-Kortekaas, W., Smulders, M.J.M., Arens, P., Vosman, B. (1994): Direct comparison of levels of genetic variation in tomato detected by a GACA-containing microsatellite probe and by random amplified polymorphic DNA. *Genome* 37, 375-381.
- Sachs, L. (1992): *Angewandte Statistik – Anwendung statistischer Methoden*. 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
- Saitou, N., Nei, M. (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- Sambrook, J., Nicklen, S., Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning. A laboratory manual*. Second edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Schüler, L., Swalve, H., Götz, K.-U. (2001): *Grundlagen der Quantitativen Genetik*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Schwenke, W. (1974): *Die Forstschädlinge Europas*. Band 2, Käfer. Paul Parey, Hamburg/Berlin.
- Segal, D., Glazer, I. (1998): Genetic approaches for improving entomopathogenic nematodes. *Proc. VIIth Int. Colloq. on Invert. Pathol. and Microb. Control*, Sapporo, 49-53.
- Selvan, S., Campbell, J.F., Gaugler, R. (1993a): Density-dependent effects on entomopathogenic nematodes (Heterorhabditidae and Steinernematidae) within an insect host. *J. Invertebr. Pathol.* 62, 278-284.
- Selvan, S., Gaugler, R., Lewis, E.E. (1993b): Biochemical energy reserves of entomopathogenic nematodes. *J. Parasitol.* 79 (2), 167-172.
- Selvan, S., Gaugler, R., Campbell, J.F. (1993c): Efficacy of entomopathogenic nematode strains against *Popillia japonica* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. *J. Econ. Entomol.* 86 (2), 353-359.
- Shapiro, D.I., Glazer, I., Segal, D. (1997): Genetic diversity in wild and laboratory populations of *Heterorhabditis bacteriophora* as determined by RAPD-PCR analysis. *Fund. appl. Nematol.* 20 (6), 581-585.
- Shetlar, D.J., Suleman, P.E., Georgis, R. (1988): Irrigation and use of entomogenous nematodes, *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis heliothidis* (Rhabditida: Steinernematidae and Heterorhabditidae), for control of Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) grubs in turfgrass. *J. Econ. Entomol.* 81 (5), 1318-1322.
- Shook, D.R., Brooks, A., Johnson, T.E. (1996): Mapping quantitative trait loci affecting life history traits in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 142, 801-817.
- Shook, D.R., Johnson, T.E. (1999): Quantitative trait loci affecting survival and fertility-related traits in *Caenorhabditis elegans* show genotype-environment interactions, pleiotropy and epistasis. *Genetics* 153, 1233-1243.
- Simões, N., Caldas, C., Rosa, J.S., Bonifassi, E., Laumond, C. (2000): Pathogenicity caused by high virulent and low virulent strains of *Steinernema carpocapsae* to *Galleria mellonella*. *J. Invertebr. Pathol.* 75, 47-54.
- Smith, H.L., Rajan, T.V. (2000): Tetracycline inhibits development of the infective-stage larvae of filarial nematodes in vitro. *Exp. Parasitol.* 95 (4), 265-270.
- Smits, P.H., Ehlers, R.-U. (1991): Identification of *Heterorhabditis* spp. by morphometric characters and RFLP and of their symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. by species specific DNA probes. *IOBC wprs Bulletin* 14 (7), 195-201.

- Smits, P.H. (1992): Control of white grubs, *Phyllopertha horticola* and *Amphimallon solstitialis* in grass with Heterorhabditid nematodes. In "Use of pathogens in scarab pest management" (Glare, T.R., Jackson, T.A., eds.), Intercept, Andover, ch. 19, 229-235.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1981): Biometry – The principles and practise of statistics in biological research. Second Edition, W.H. Freeman and Company, USA.
- Stahel, W.A. (1995): Statistische Datenanalyse – Eine Einführung für Naturwissenschaftler. Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden.
- Steiner, G. (1929): *Neoaplectana glaseri* n. g. n. sp. (Oxyuridae) a new nemic parasite of the Japanese beetle (*Popillia japonica* Newm.). Journal of the Washington Academy of Science 19, 436-440.
- Steinhaus, E.A. (1958): Stress as a factor in insect disease. Proc. XInt. Congr. Entomol. 4, 725-730.
- Strauch, O., Stoessel, S., Ehlers, R.-U. (1994): Culture conditions define automictic or amphimictic reproduction in entomopathogenic rhabditid nematodes of the genus *Heterorhabditis*. Fundam. Appl. Nematol. 17, 575-582.
- Strauch, O., Ehlers, R.-U. (1998): Food signal production of *Photorhabdus luminescens* inducing the recovery of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. in liquid culture. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50, 369-374.
- Stuart, R.J., Gaugler, R. (1996): Genetic adaptation and founder effect in laboratory populations of the entomopathogenic nematode *Steinernema glaseri*. Can. J. Zool. 74, 164-170.
- Stuart, R.J., Hatab, M.A., Gaugler, R. (1998): Sex ratio and the infection process in entomopathogenic nematodes: are males the colonizing sex? J. Invertebr. Pathol. 72, 288-295.
- Sudhaus, W. (1993): Die mittels symbiontischer Bakterien entomopathogenen Nematoden-Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema* sind keine Schwestertaxa. Verh. Dtsch. Zool. Ges. 86, 146.
- Sulistyanto, D., Ehlers, R.-U. (1996): Efficacy of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis megidis* and *Heterorhabditis bacteriophora* for the control of grubs (*Phyllopertha horticola* and *Aphodius contaminatus*) in golf course turf. Biocontrol and Science 6: 247-250.
- Sulistyanto, D. (1997): Untersuchungen zum Wirkungspotential entomopathogener Nematoden (*Heterorhabditis* spp.) zur biologischen Bekämpfung von Engerlingen des Gartenlaubkäfers (*Phyllopertha horticola*). Dissertation am Institut für Phytopathologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Swofford, D.L. (2001): PAUP*: Phylogenetic analysis using maximum parsimony (* and other methods). Version 4.0b8. Sinauer Associates, Sunderland.
- Szállas, E., Pukall, R., Pamjav, H., Kovács, G., Buzás, Fodor, A., Stackebrandt, E. (2001): Passengers who missed the train: comparative sequence analysis, PhastSystem PAGE RFLP and automated RiboPrint phenotypes of *Photorhabdus* strains. In Griffin, C.T., Burnell, A.M., Downes, M.J., Mulder, R. (eds.): Developments in entomopathogenic nematode/bacterial research, Europ. Comm. Publ. EUR 19696, Luxembourg, 36-53.
- Tachibana, M., Hori, H., Suzuki, N., Uechi, T., Kobayashi, D., Iwahana, H., Kaya, H.K. (1996): Larvicidal activity of the symbiotic bacterium *Xenorhabdus japonicus* from the entomopathogenic nematode *Steinernema kushida* against *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae). J. Invertebr. Pathol. 68, 152-159.
- Tanada, Y., Kaya, H.K. (1993): Insect pathology. Academic Press Inc.
- Tantawy, A.O., Reeve, E.C.R. (1956): Studies in quantitative inheritance. IX. The effects of inbreeding at different rates in *Drosophila melanogaster*. Zeitschrift für indukt. Abstammungs- und Vererbungslehre 87, 648-667.
- Tautz, D., Renz, M. (1984): Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. Nucleic Acids Res. 12, 4127-4138.

- Thurston, G.S., Kaya, H.K., Burlando, T.M., Harrison, R.E. (1993): Milky disease bacterium as a stressor to increase susceptibility of scarabaeid larvae to an entomopathogenic nematode. *J. Invertebr. Pathol.* 61, 167-172.
- Tomalak, M. (1994): Selective Breeding of *Steinernema feltiae* (Filipjev) (Nematoda: Steinernematidae) for improved efficacy in control of a Mushroom Fly, *Lycoriella solani* Winnertz (Diptera: Sciaridae). *Biocontrol Science and Technology* 4, 187-198.
- Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J. (2000): Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Research* 10, 967-981.
- Trenczek, T. (2001): Insect responses against pathogens and parasites. In Griffin, C.T., Burnell, A.M., Downes, M.J., Mulder, R. (eds.): *Developments in entomopathogenic nematode/bacterial research*, Europ. Comm. Publ. EUR 19696, Luxembourg, 189-203.
- Treutlein, J., Smith, G.F., Van Wyk, B.-E., Wink, M. (2003): Phylogenetic relationships in Asphodelaceae (subfamily Alooideae) inferred from chloroplast DNA sequences (*rbcL*, *matK*) and from genomic fingerprinting (ISSR). *Taxon* 52, 193-207.
- Triga, D., Pamjav, H., Vellai, T., Fodor, A., Buzás, Z. (1999): Gel electrophoretic restriction fragment length polymorphism analysis of DNA derived from individual nematodes, using the PhastSystem. *Electrophoresis* 20, 1274-1279.
- Van Gundy, S.D., Bird, A.F., Wallace, H.R. (1967): Aging and starvation in larvae of *Meloidogyne javanica* and *Tylenchulus semipenetrans*. *Phytopathology* 57, 559-571.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23 (21), 4407-4414.
- Wagner, W., Schnetter, W. (2001): Proteasen im Darmsaft des Feldmaikäfers (*Melolontha melolontha*) und Abbau des Cry8C-Toxins von *Bacillus thuringiensis* Stamm Buibui. *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent.* 13, 169-172.
- Wang, Y., Gaugler, R. (1998): Host and penetration site location by entomopathogenic nematodes against Japanese beetle larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 72, 313-318.
- Wägele, J.-W. (2000): *Grundlagen der Phylogenetischen Systematik*. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., Meyer, W. (1995): *DNA fingerprinting in plants and fungi*. CRC Press, Inc., Florida.
- Welsh, J., McClelland, M. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18 (24), 7213-7218.
- Werkmeister, F. (1967): Untersuchungen über den Einfluss der Selektionsintensität und der genetischen Drift auf den Erfolg der künstlichen Selektion, dargestellt an Zuchtversuchen mit *Drosophila melanogaster*. *Zeitschrift für Tierzüchtung und Züchtungsbiologie* 83, 371-382.
- Westerman, P.R. (1997): Biological control of *Otiiorhynchus sulcatus* by insect parasitic nematodes, *Heterorhabditis* spp., at low temperatures; a systems analytical approach. PhD Thesis Wageningen University.
- Wichers, H.J., Peetsma, G.J., Malingre, T.M., Huizing, H.J. (1984): Purification and properties of a phenol oxidase derived from suspension cultures of *Mucuna pruriens*. *Planta* 162, 334-341.
- Wijbenga, J., Rodgers, P.B. (1994): Observations on behaviour of entomopathogenic nematodes in a sand bio-assay system. VIth Int. Colloq. Invertebr. Pathol. and Microbial Control, 28. Aug.-2. Sept. 1994, Montpellier, Frankreich, Abstracts, 264.
- Williams, B.G., Dye, C. (1994): Maximum likelihood for parasitologists. *Parasitology Today* 10 (12), 489-493.

- Wink, M., Sauer-Gürth, H., Martinez, F., Doval, G., Blanco, G., Hatzofe, O. (1998): The use of (GACA)₄ PCR to sex old world vultures (Aves: Accipitridae). *Molecular Ecology* 7, 779-782.
- Woodring, J.L., Kaya, H.K. (1988): Steinernematid and Heterorhabditid nematodes: A handbook of techniques. *Arkansas Agric. Exp. Stn. South. Coop. Bull.* 331.
- Wouts, W.M. (1981): Mass production of the entomogenous nematode *Heterorhabditis heliothidis* (Nematoda: Heterorhabditidae) on artificial media. *Nematologica* 13, 467-469.
- Wright, R.J., Villani, M.G., Agudelo-Silva, F. (1988): Steinernematid and Heterorhabditid nematodes for control of larval European chafers and Japanese beetles (Coleoptera: Scarabaeidae) in potted yew. *J. Economic Entomology* 81 (1): 152-157.
- Wyniger, R. (1974): *Insektenzucht*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Yoo, S.K., Brown, I., Gaugler, R. (2000): Liquid media development for *Heterorhabditis bacteriophora*: lipid source and concentration. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54 (6), 759-763.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., Labuda, D. (1994): Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20, 176-183.

8. Anhang

Im Anhang findet sich Folgendes:

- Tabellen zu den Berechnungen der Verteilungsfunktionen aus dem Abschnitt „Modelle zur Beschreibung der Befallsstrategie“ (3.4.5) - S. 236-240 (Tab. 8.1-8.5)
- Abbildungen eines Teils der Gele von den RAPD- und ISSR-PCR-Analysen sowie die berechneten Distanzmatrizen zu den Abschnitten 3.7.1 und 3.7.2
 - RAPD-PCR - S. 241-252 (Abb. 8.1-8.11, Tab. 8.6)
 - ISSR-PCR - S. 253-260 (Abb. 8.12-8.18, Tab. 8.7)
 - ISSR-PCR (Inzuchtlinien) - S. 261-269 (Abb. 8.19-8.26, Tab. 8.8)
- Publikation zu den Freilandversuchen - S. 270-275
Berner, M. & Schnetter, W. (2002): Field trials with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* against white grubs of the European cockchafer (*Melolontha melolontha*) in the southern part of Germany. IOBC wprs Bulletin 25 (7), 29-34.

Diese Publikation wird hier dargestellt, da die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Freilandversuche in der vorliegenden Arbeit nicht explizit abgehandelt werden.

Tabellen zu den Berechnungen der Verteilungsfunktionen

Tab. 8.1. Häufigkeitsverteilung von *Tenebrio*-Larven mit einer bestimmten Anzahl penetrierter Dauerlarven (= x) von *H. bacteriophora* im **Testsystem I** bei verschiedenen Nematoden-Dichten (N). Die Auswertung erfolgte 7 Tage nach Applikation der Nematoden. Dargestellt ist die beobachtete Häufigkeitsverteilung (f) und die mit der Negativen Binomial- (NBV), der Binomial- (BV) und der Poisson-Verteilung (PV) berechneten (erwarteten) Verteilungen (ϕ). Der Term $(f-\phi)^2/\phi$ des Chi-Quadrat-Tests ist ein Maß für die Abweichung des Beobachtungsvom Erwartungswert; die Summe dieser Terme ergibt die jeweilige Prüfstatistik (= χ^2). Für die Statistik werden die Werte so zusammengefasst (gepoolt), dass Klassen mit $f(x) > 5$ entstehen. Der Freiheitsgrad (FG) ergibt sich aus der Anzahl der Klassen minus eins. Die mit * versehenen Werte stimmen mit den Erwartungswerten des Modells überein (* = $\alpha < 0,05$; ** = $\alpha < 0,01$; *** = $\alpha < 0,001$). << = extrem hohe Abweichung.

N (DL)	x	f	NBV		BV		PV	
			ϕ	$(f-\phi)^2/\phi$	ϕ	$(f-\phi)^2/\phi$	ϕ	$(f-\phi)^2/\phi$
8-16 (DF = 2)	0	21	21,44	0,015	17,72	1,033	20,37	0,005
	1	13	9,30	0,311	14,24	0,736	13,75	0,013
	2	5	2,69	1,985	5,91	0,139	4,64	0,000
	3	1	0,65	2,820	1,69	0,055	1,04	0,007
	4	0	0,14	0,141	0,37	0,369	0,18	0,010
	5	0	0,03	0,028	0,06	0,062	0,02	0,005
	6	0	0,01	0,005	0,01	0,008	0,00	0,002
	7	0	0,00	0,001	0,00	0,001	0,00	0,000
Σ		40		5,306*		2,404*		0,041*
40-80 (DF = 3)	0	6	3,46	1,859	0,91	28,298	0,49	61,244
	1	5	2,42	2,759	2,83	1,672	2,00	4,515
	2	2	1,69	0,058	4,45	1,346	4,03	1,022
	3	1	1,18	0,027	4,90	3,099	5,42	3,605
	4	2	0,82	1,685	4,40	1,313	5,47	2,201
	5	2	0,57	3,539	3,55	0,676	4,41	1,321
	6	2	0,40	6,378	2,66	0,163	2,97	0,316
	7	1	0,28	1,853	1,85	0,387	1,71	0,296
	8	3	0,20	40,253	1,17	2,856	0,86	5,285
	9	0	0,14	0,136	0,67	0,672	0,39	0,387
10	4	0,10	160,092	0,35	38,410	0,16	94,537	
Σ		28		218,638		78,893		174,730
160-320 (DF = 3)	0	1	0,96	0,002	0,00	5880,569	0,00	119969,896
	1	3	0,88	5,137	0,00	4479,567	0,00	71363,361
	2	1	0,80	0,049	0,01	82,994	0,00	1046,309
	3	1	0,73	0,097	0,05	19,919	0,00	205,879
	4	0	0,67	0,671	0,13	0,132	0,02	0,018
	5	1	0,61	0,243	0,30	1,586	0,06	16,219
	6	1	0,56	0,343	0,58	0,303	0,14	5,342
	7	3	0,51	12,041	0,94	4,481	0,30	24,297
	8	0	0,47	0,470	1,33	1,329	0,57	0,567
	9	2	0,43	5,742	1,67	0,066	0,95	1,148
	10-15	4	1,91	10,200	8,963	4,446	15,16	1,69
	16-21	7	1,12	68,787	4,800	5,719	12,03	9,16
	22-30	4	0,39	35,960	0,421	20586,949	0,76	97,14
31-64	3	0,11	347,934	0,258	<<	0,00	<<	
Σ		31		487,674		<<		<<

Tab. 8.2. Häufigkeitsverteilung von *Tenebrio*-Larven mit einer bestimmten Anzahl penetrierter Dauerlarven (= x) von *S. glaseri* im **Testsystem I** bei verschiedenen Nematoden-Dichten (N). Alle übrigen Angaben siehe Tab. 8.1.

N (DL)	x	f	NBV		BV		PV	
			ϕ	$(f-\phi)^2/\phi$	ϕ	$(f-\phi)^2/\phi$	ϕ	$(f-\phi)^2/\phi$
8-16 (DF = 2)	0	9	6,79	0,716	12,41	0,935	2,62	15,554
	1	7	5,15	0,668	9,97	0,883	6,11	0,130
	2	3	3,90	0,207	4,13	0,311	7,13	2,390
	3	3	2,95	0,001	1,19	2,775	5,54	1,167
	4	0	2,24	2,235	0,26	0,258	3,23	3,234
	5	0	1,69	1,693	0,04	0,044	1,51	1,509
	6	1	1,28	0,062	0,01	169,811	0,59	0,291
	7	1	0,97	0,001	0,00	1636,348	0,20	3,308
	8	1	0,74	0,095	0,00	19761,464	0,06	15,585
	9	1	0,56	0,353	0,00	301443,001	0,01	65,624
10-15	1	0,74	1,872	0,00	<<	0,00	1364,073	
Σ		27		7,902**		<<		1472,864
40-80 (DF = 3)	0	6	7,24	0,214	0,79	34,097	0,00	19212,148
	1	1	6,96	5,099	2,64	1,015	0,02	54,002
	2	2	3,34	0,537	4,14	1,108	0,09	43,039
	3	2	2,14	0,009	4,55	1,432	0,27	11,039
	4	1	1,54	0,189	4,09	2,335	0,65	0,194
	5	3	1,18	2,798	3,29	0,025	1,23	2,536
	6	1	0,95	0,003	2,46	0,865	1,96	0,469
	7	0	0,78	0,778	1,71	1,705	2,67	2,669
	8	1	0,65	0,184	1,08	0,006	3,18	1,497
	9	1	0,56	0,351	0,62	0,232	3,37	1,669
	10-15	4	1,27	7,559	0,53	38,205	8,23	2,421
16-74	4	0,34	233,572	0,24	<<	0,06	<<	
Σ		26		251,291		<<		<<
160-320 (DF = 2)	0	1	0,92	0,007	0,00	8019,691	0,00	22255,021
	1	1	0,83	0,034	0,00	677,634	0,00	1653,487
	2	0	0,75	0,751	0,01	0,009	0,00	0,004
	3	2	0,68	2,580	0,03	115,341	0,02	215,832
	4	1	0,61	0,246	0,10	8,398	0,06	14,411
	5	1	0,55	0,363	0,22	2,698	0,16	4,245
	6	1	0,50	0,505	0,43	0,773	0,37	1,082
	7	1	0,45	0,673	0,69	0,137	0,71	0,121
	8	1	0,41	0,869	1,05	0,002	1,19	0,030
	9	1	0,37	1,095	1,42	0,123	1,78	0,340
	10-15	10	1,56	57,748	9,58	1,629	18,12	4,761
	16-21	4	0,58	21,036	2,43	15,077	7,98	3,51
22-55	3	0,08	378,329	0,62	<<	0,02	<<	
Σ		27		464,235		<<		<<

Tab. 8.3. Häufigkeitsverteilung von *Tenebrio*-Larven mit einer bestimmten Anzahl penetrierter Dauerlarven (= x) von *H. bacteriophora* im **Testsystem II** bei verschiedenen Nematoden-Dichten (N). Die Auswertung erfolgte 7 Tage nach Applikation der Nematoden. Alle übrigen Angaben siehe Tab. 8.1.

N (DL)	X	f	NBV		BV		PV	
			ϕ	$(f-\phi)^2/\phi$	ϕ	$(f-\phi)^2/\phi$	ϕ	$(f-\phi)^2/\phi$
20 (FG = 7)	0	215	239,16	2,441	142,36	37,069	180,88	6,437
	1	251	141,87	83,951	210,03	7,993	214,16	6,338
	2	57	84,15	8,761	147,19	55,260	126,78	38,408
	3	25	49,92	12,439	65,15	24,740	50,04	12,527
	4	14	29,61	8,230	20,42	2,021	14,81	0,044
	5	11	17,56	2,453	4,82	7,919	3,51	16,008
	6	6	10,42	1,874	0,89	29,378	0,69	40,709
	7	2	6,18	2,828	0,13	26,624	0,12	30,287
	8	3	3,67	0,121	0,02	566,362	0,02	513,495
	9	3	2,17	0,313	0,00	5813,062	0,00	3942,732
	10	2	1,29	0,391	0,00	31868,091	0,00	14818,559
	13	1	0,27	1,983	0,00	<<	0,00	3831114,610
	15	1	0,09	8,650	0,00	<<	0,00	<<
Σ		591		135,655		<<		<<
40-160 (FG = 4)	0	6	9,32	1,183	2,96	3,133	0,62	46,338
	1	4	6,97	1,268	8,41	2,316	2,53	0,855
	2	3	5,22	0,943	12,38	7,109	5,13	0,884
	3	8	3,90	4,294	13,01	1,929	6,93	0,164
	4	2	2,92	0,291	5,52	2,242	7,03	3,599
	5	4	2,19	1,504	8,86	2,669	5,70	0,508
	6	3	1,64	1,137	8,55	3,602	3,85	0,189
	7	2	1,22	0,492	0,29	9,961	2,23	0,024
	8	1	0,92	0,008	4,13	2,374	1,13	0,015
	9	1	0,38	0,989	4,21	2,451	0,08	11,188
	16	1	0,09	9,197	4,21	2,451	0,00	6262,521
	17	1	0,07	12,910	0,00	<<	0,00	26257,859
Σ		36		34,217		<<		32584,145

Tab. 8.4. Häufigkeitsverteilung von *Tenebrio*-Larven mit einer bestimmten Anzahl penetrierter Dauerlarven (= x) von *S. glaseri* im **Testsystem II** bei verschiedenen Nematoden-Dichten (N). Alle übrigen Angaben siehe Tab. 8.1.

N (DL)	X	f	NBV		BV		PV	
			ϕ	$(f-\phi)^2/\phi$	ϕ	$(f-\phi)^2/\phi$	ϕ	$(f-\phi)^2/\phi$
20 (FG = 8)	0	11	10,26	0,054	0,92	110,012	0,66	163,289
	1	7	7,97	0,118	5,96	0,180	3,16	4,647
	2	13	6,20	7,473	11,68	0,150	7,64	3,756
	3	8	4,82	2,106	15,22	3,425	12,30	1,504
	4	12	3,74	18,221	12,39	0,012	14,85	0,548
	5	5	2,91	1,504	11,64	3,784	14,35	6,088
	6	7	2,26	9,938	11,25	1,606	11,55	1,790
	7	3	1,76	0,880	8,70	3,737	7,97	3,096
	8	4	1,37	5,084	5,47	0,395	4,81	0,136
	9-10	3	0,82	5,738	1,20	2,700	1,25	2,469
11-20	9	1,76	58,288	0,45	<<	0,64	85942,618	
Σ		82		109,403		<<		86129,941
40-160 (DF = 8)	0	1	4,27	2,503	0,01	70,045	0,00	13092,851
	1	3	4,00	0,251	0,12	72,300	0,00	8781,312
	2	5	3,75	0,416	0,47	44,131	0,01	3629,965
	3	5	3,52	0,626	2,22	3,462	0,03	804,230
	4	2	3,30	0,510	2,35	0,053	0,10	34,956
	5	2	3,09	0,385	3,53	0,665	0,28	10,761
	6	1	2,90	1,242	0,00	665099,685	0,62	0,237
	7	3	2,72	0,030	4,47	0,481	1,18	2,792
	8	2	2,55	0,117	4,03	1,026	1,98	0,000
	9	1	2,39	0,806	2,68	1,056	2,95	1,293
	10	6	2,24	6,327	2,69	4,086	3,96	1,047
11-54	20	16,72	12,368	2,77	<<	29,68	<<	
Σ		51		25,579***		<<		<<

Tab. 8.5. Zusammenfassung aller ermittelten Parameter der Negativen Binomial-Verteilung (NBV) und der Poisson-Verteilung (PV) bei verschiedenen Nematoden-Dichten (N). Für k sind die Schätzwerte von Bliss (1953) und Taylor (1961) angegeben. Für die Berechnungen mit der NBV wurden die k -Werte nach Bliss (1953) verwendet. Sofern die Daten zusammengefasst (gepoolt) wurden, sind die entsprechenden Werte in Klammern angegeben. (vgl. auch Tab. 3.8)

Nematodenart	Wirtsinsekt	Testsystem	N	m	s^2	k (Bliss, 1953)	k (Taylor, 1961)
<i>H.b.</i>	<i>M.m.</i> (L3)	I	8000	68	1259,73	3,88	n.m.
			<i>M.m.</i> (L2)	I	500	98,00	10367,92
	1000	86,00			4701,98	1,60	1,54
	2000	210,67			5321,26	8,71	2,11
	3000	372,00			54544,20	2,55	2,58
	6000	323,33			102746,53	6,21	2,45
	<i>T.m.</i>	I	8	0,50	0,47	-9,51	-4,47
			16	0,85 (0,68)	1,08 (0,79)	3,12 (4,00)	3,05 (7,00)
			40	2,53	9,27	0,95	1,48
			80	5,77 (4,04)	13,19 (13,37)	4,48 (1,75)	1,53 (1,48)
			160	15,73	264,36	0,99	1,85
			320	14,69 (15,13)	109,43 (177,18)	2,28 (1,14)	1,82 (1,84)
	<i>T.m.</i>	II	10	0,50	0,29	-1,19	2,26
			20	1,18 (1,18)	2,91 (2,91)	0,80 (0,81)	2,19 (2,19)
40			3,63	15,80	1,08	3,37	
80			2,64	4,26	4,30	2,91	
160			8,00 (4,06)	23,60 (16,11)	4,10 (1,36)	5,10 (3,56)	
<i>S.g.</i>	<i>M.m.</i> (L3)	I	1000	13,98	5904,90	3,40	n.m.
			<i>M.m.</i> (L2)	I	32	5,33	10,30
	125	30,70			256,30	4,18	6,40
	500	210,00			2821,00	16,89	3,51
	1000	200,00			5564,00	7,46	3,55
	<i>T.m.</i>	I	8	1,50	2,88	1,63	1,12
			16	3,23 (2,33)	16,02 (9,61)	0,82 (0,75)	0,96 (0,99)
			40	6,36	74,25	0,60	0,96
			80	13,25 (9,54)	427,12 (238,82)	0,42 (0,40)	1,03 (1,00)
			160	14,06	205,81	1,03	1,04
			320	12,55 (13,44)	48,87 (138,10)	4,34 (1,45)	1,03 (1,04)
	<i>T.m.</i>	II	10	2,23	2,37	35,52	9,91
			20	5,78 (4,83)	25,46 (21,67)	1,70 (1,38)	1,81 (2,08)
			40	8,85	57,34	1,62	1,41
80			16,50	411,64	0,69	1,08	
160			21,20 (13,41)	294,19 (214,41)	1,65 (0,89)	0,99 (1,17)	

RAPD-PCR

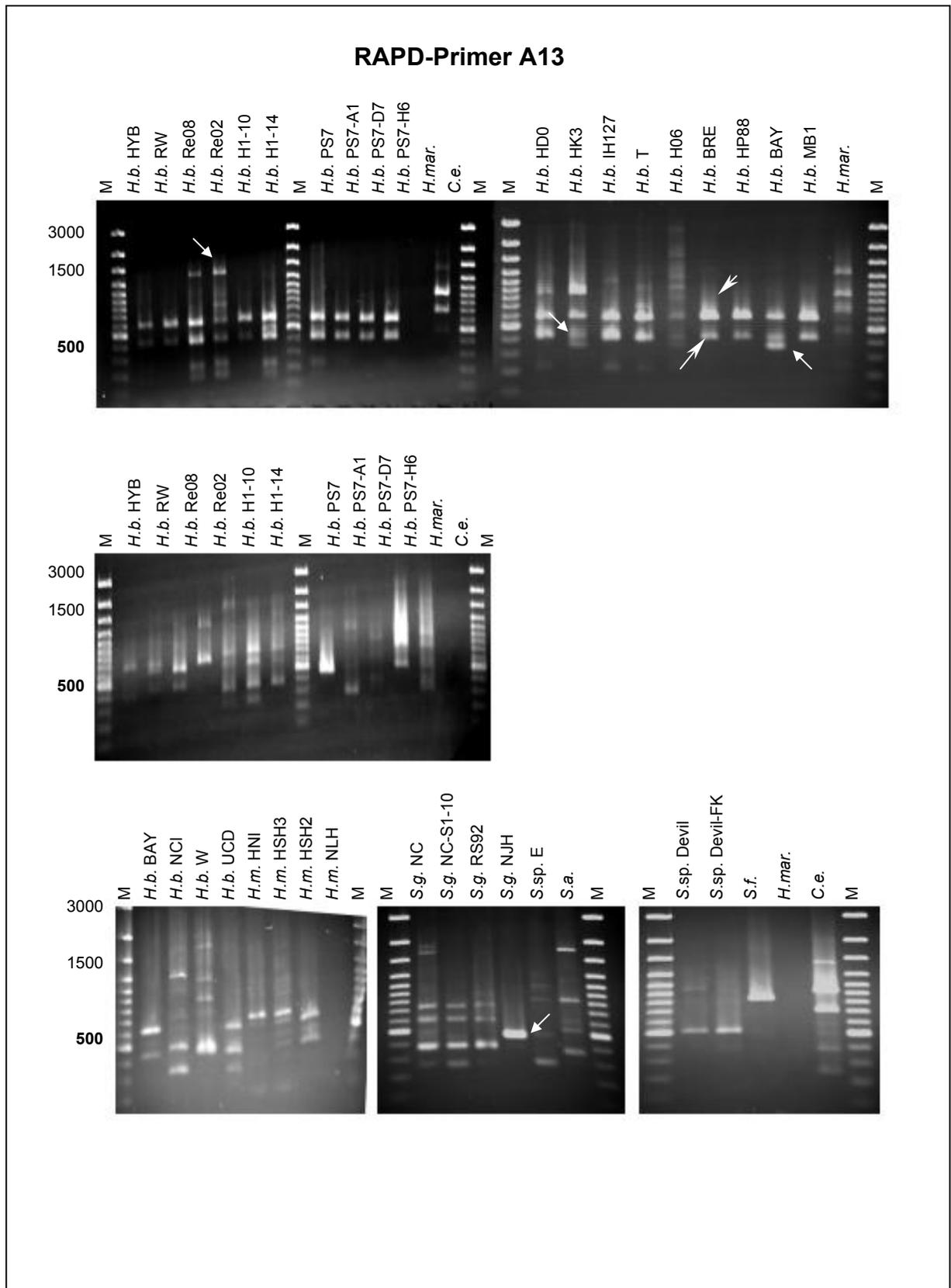


Abb. 8.1. RAPD-PCR-Profil des Primers A13 von 35 Arten bzw. Stämmen/Linien der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema*. Die mit offenen Pfeilen (►) gekennzeichneten Banden sind gattungs- bzw. artspezifisch. Die anderen Pfeile (▶) verweisen auf einige polymorphe Banden innerhalb einer Art. M = Marker (3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp).

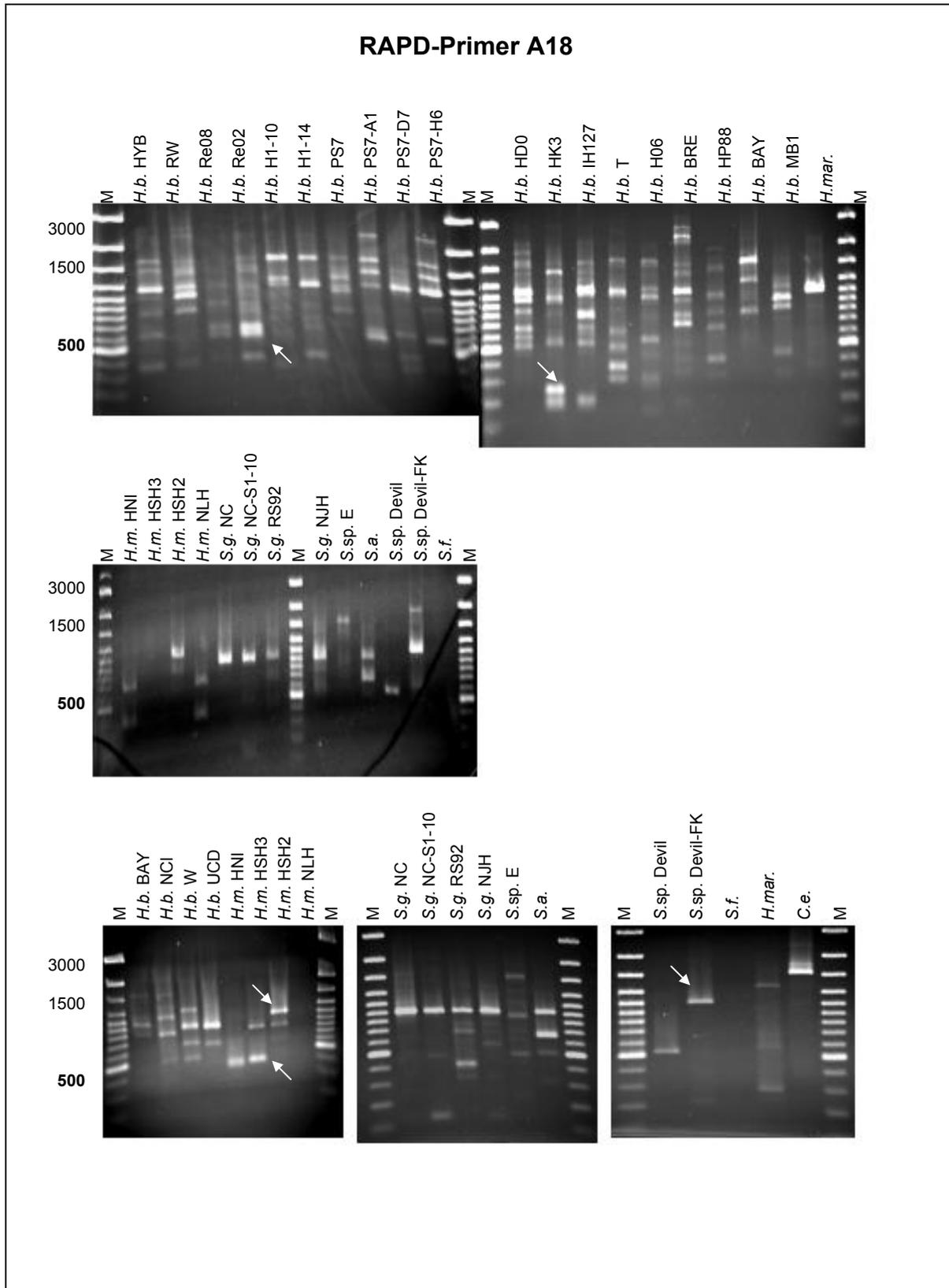


Abb. 8.2. RAPD-PCR-Profil des Primers A18 von 35 Arten bzw. Stämmen/Linien der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema*. Die mit offenen Pfeilen (►) gekennzeichneten Banden sind gattungs- bzw. artspezifisch. Die anderen Pfeile (▶) verweisen auf einige polymorphe Banden innerhalb einer Art. M = Marker (3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp).

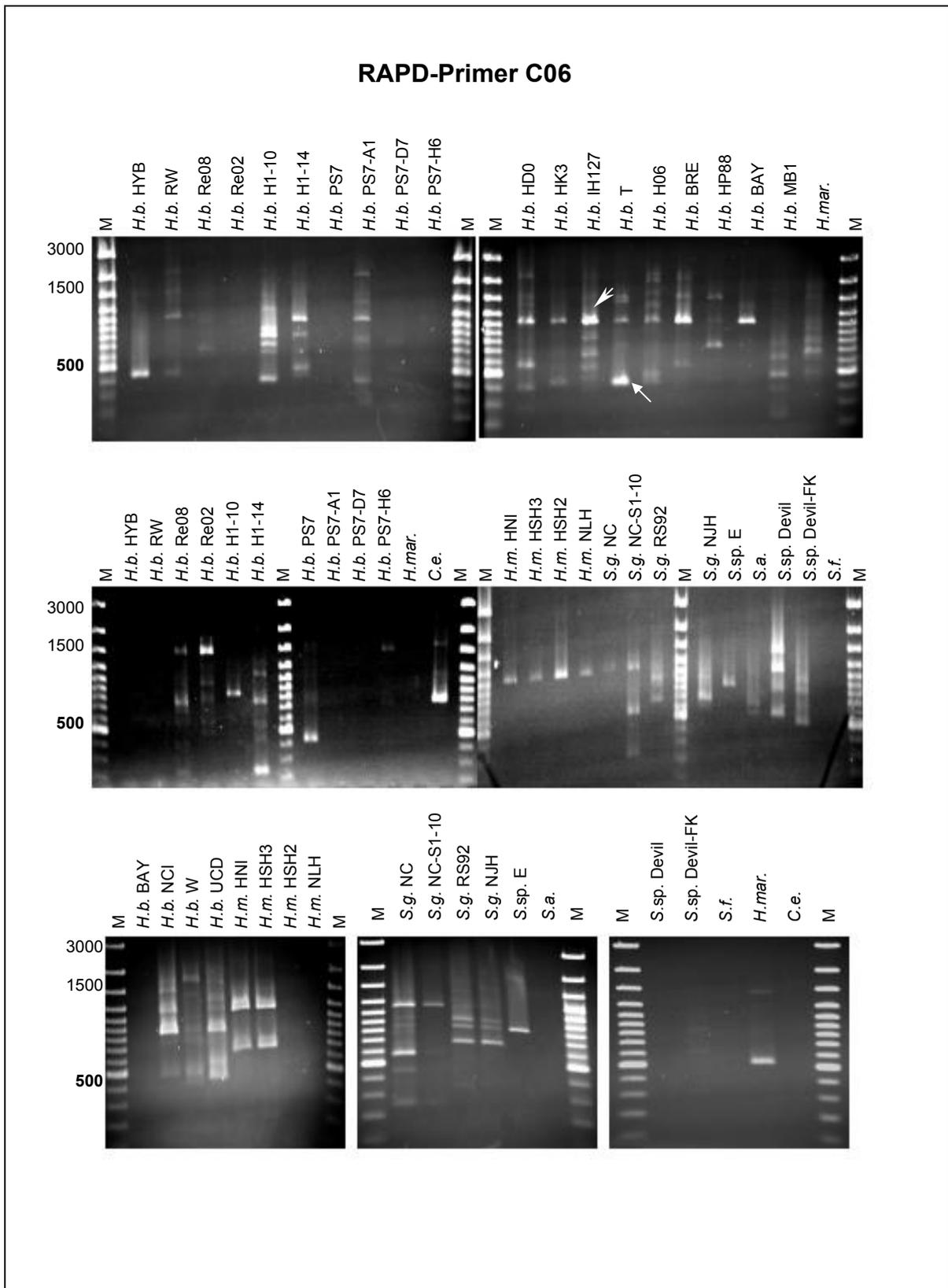


Abb. 8.3. RAPD-PCR-Profil des Primers C06 von 35 Arten bzw. Stämmen/Linien der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema*. Die mit offenen Pfeilen (►) gekennzeichneten Banden sind gattungs- bzw. artspezifisch. Die anderen Pfeile (▶) verweisen auf einige polymorphe Banden innerhalb einer Art. M = Marker (3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp).

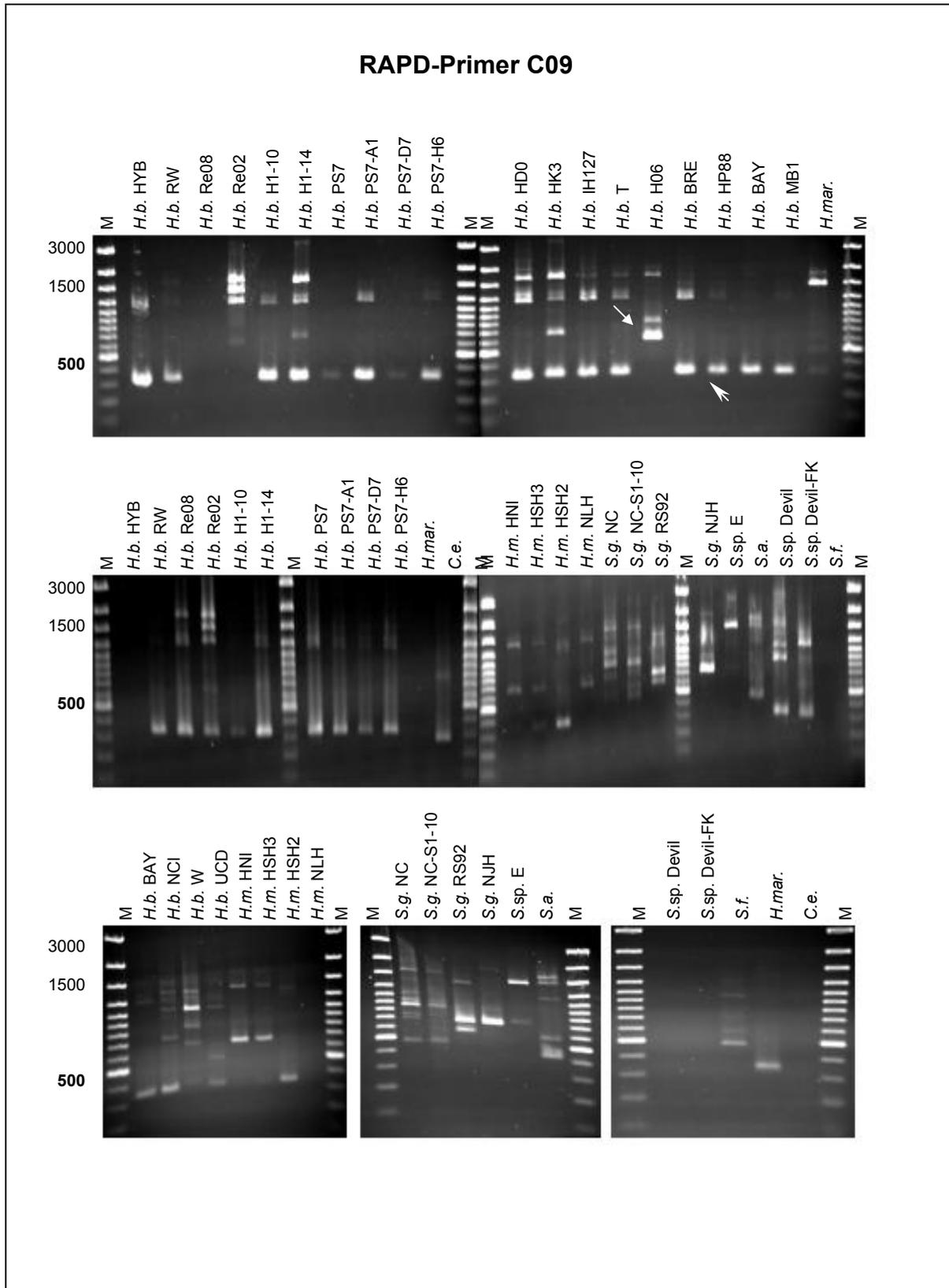


Abb. 8.4. RAPD-PCR-Profil des Primers C09 von 35 Arten bzw. Stämmen/Linien der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema*. Die mit offenen Pfeilen (►) gekennzeichneten Banden sind gattungs- bzw. artspezifisch. Die anderen Pfeile (▶) verweisen auf einige polymorphe Banden innerhalb einer Art. M = Marker (3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp).

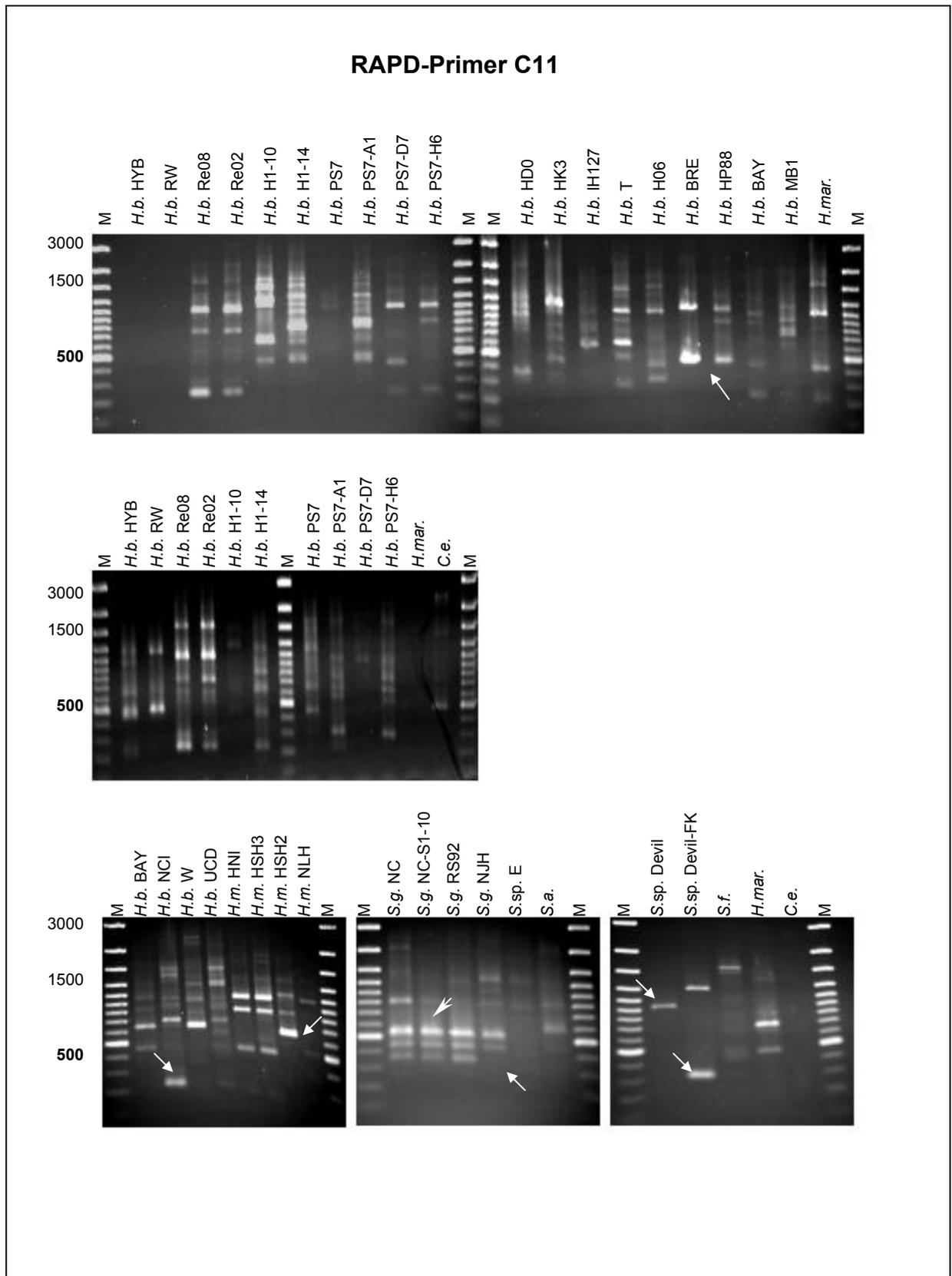


Abb. 8.5. RAPD-PCR-Profil des Primers C11 von 35 Arten bzw. Stämmen/Linien der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema*. Die mit offenen Pfeilen (►) gekennzeichneten Banden sind gattungs- bzw. artspezifisch. Die anderen Pfeile (▶) verweisen auf einige polymorphe Banden innerhalb einer Art. M = Marker (3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp).

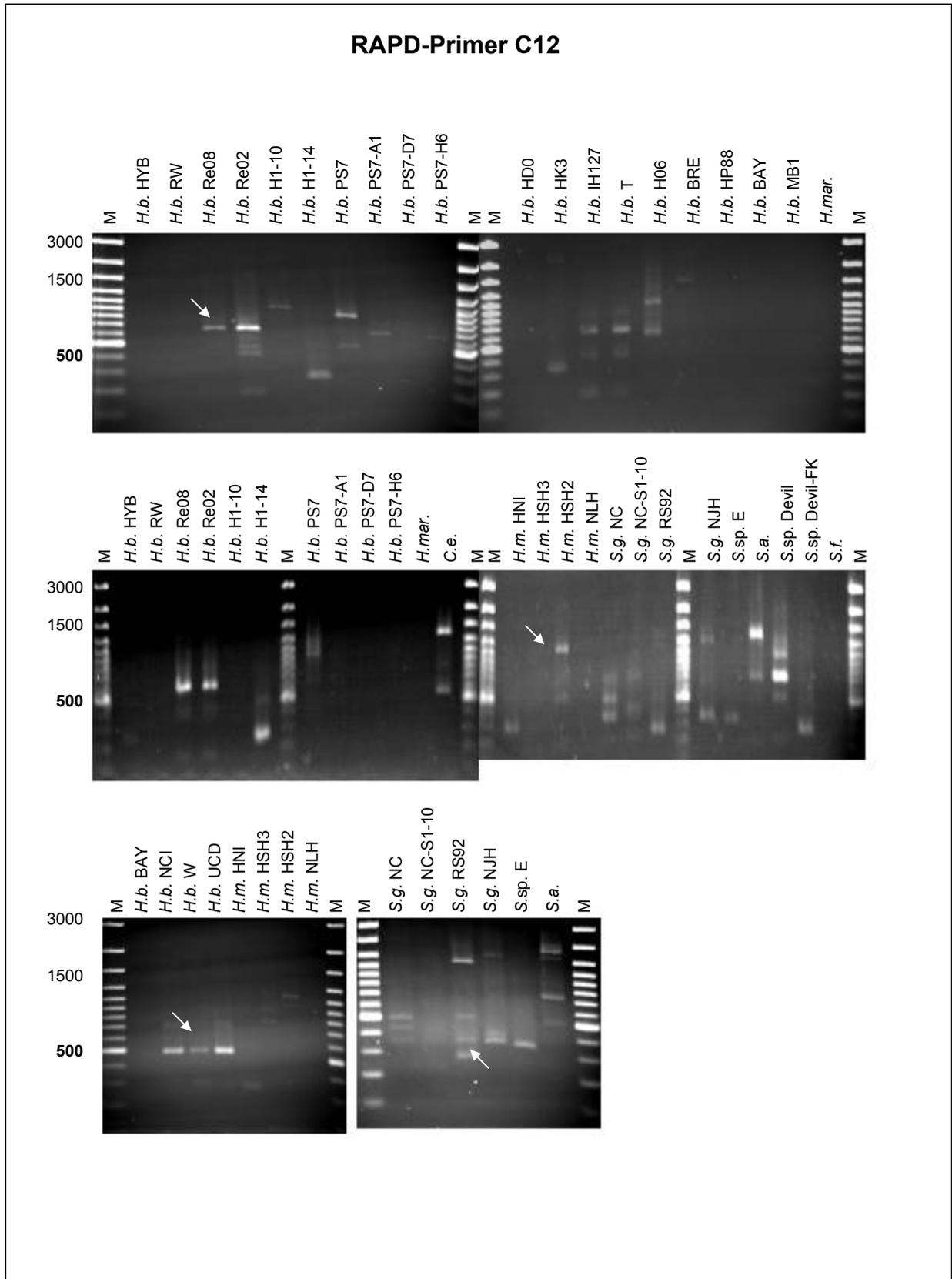


Abb. 8.6. RAPD-PCR-Profil des Primers C12 von 35 Arten bzw. Stämmen/Linien der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema*. Die mit offenen Pfeilen (►) gekennzeichneten Banden sind gattungs- bzw. artspezifisch. Die anderen Pfeile (▶) verweisen auf einige polymorphe Banden innerhalb einer Art. M = Marker (3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp).

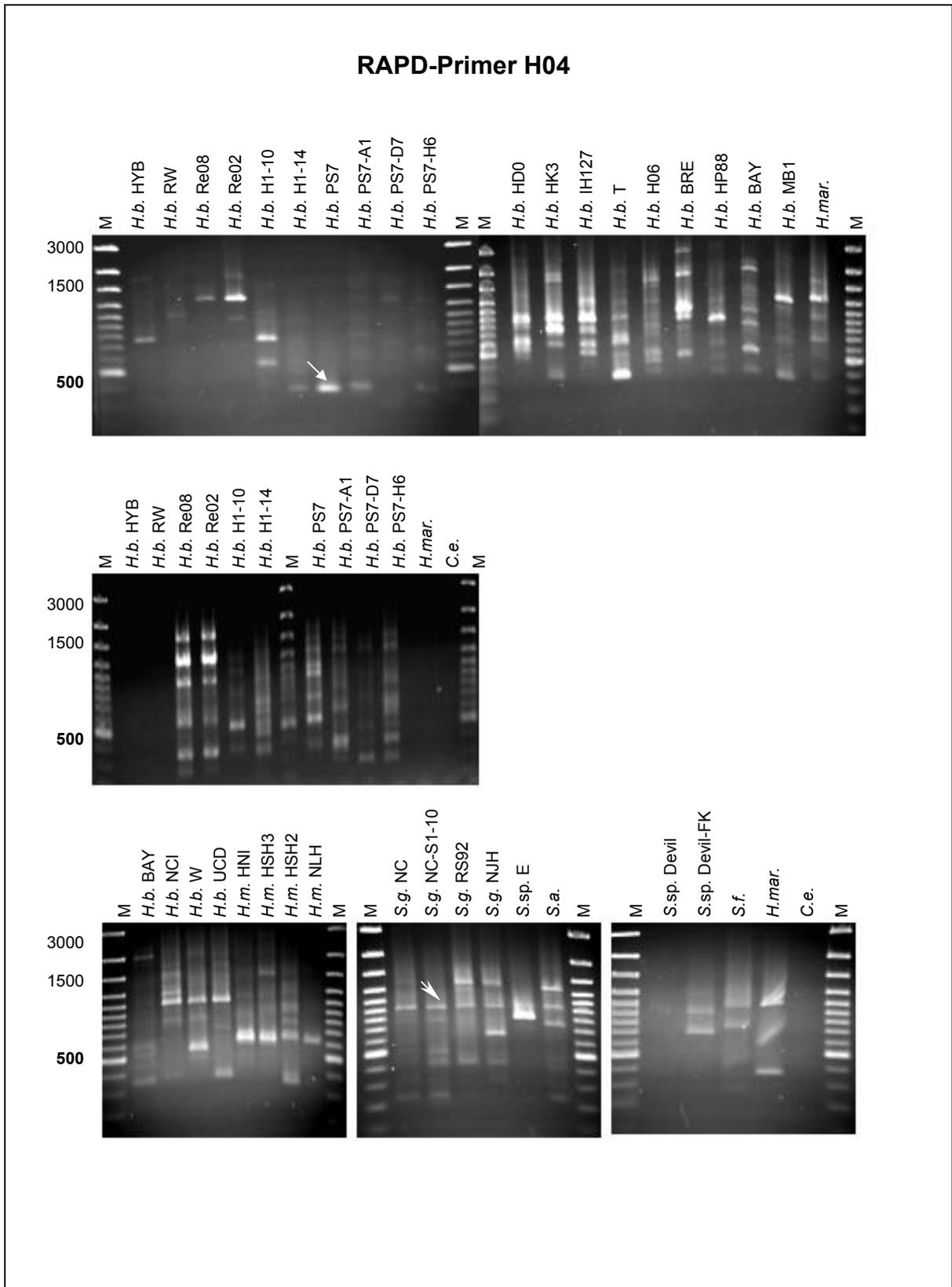


Abb. 8.7. RAPD-PCR-Profil des Primers H04 von 35 Arten bzw. Stämmen/Linien der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema*. Die mit offenen Pfeilen (►) gekennzeichneten Banden sind gattungs- bzw. artspezifisch. Die anderen Pfeile (▶) verweisen auf einige polymorphe Banden innerhalb einer Art. M = Marker (3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp).

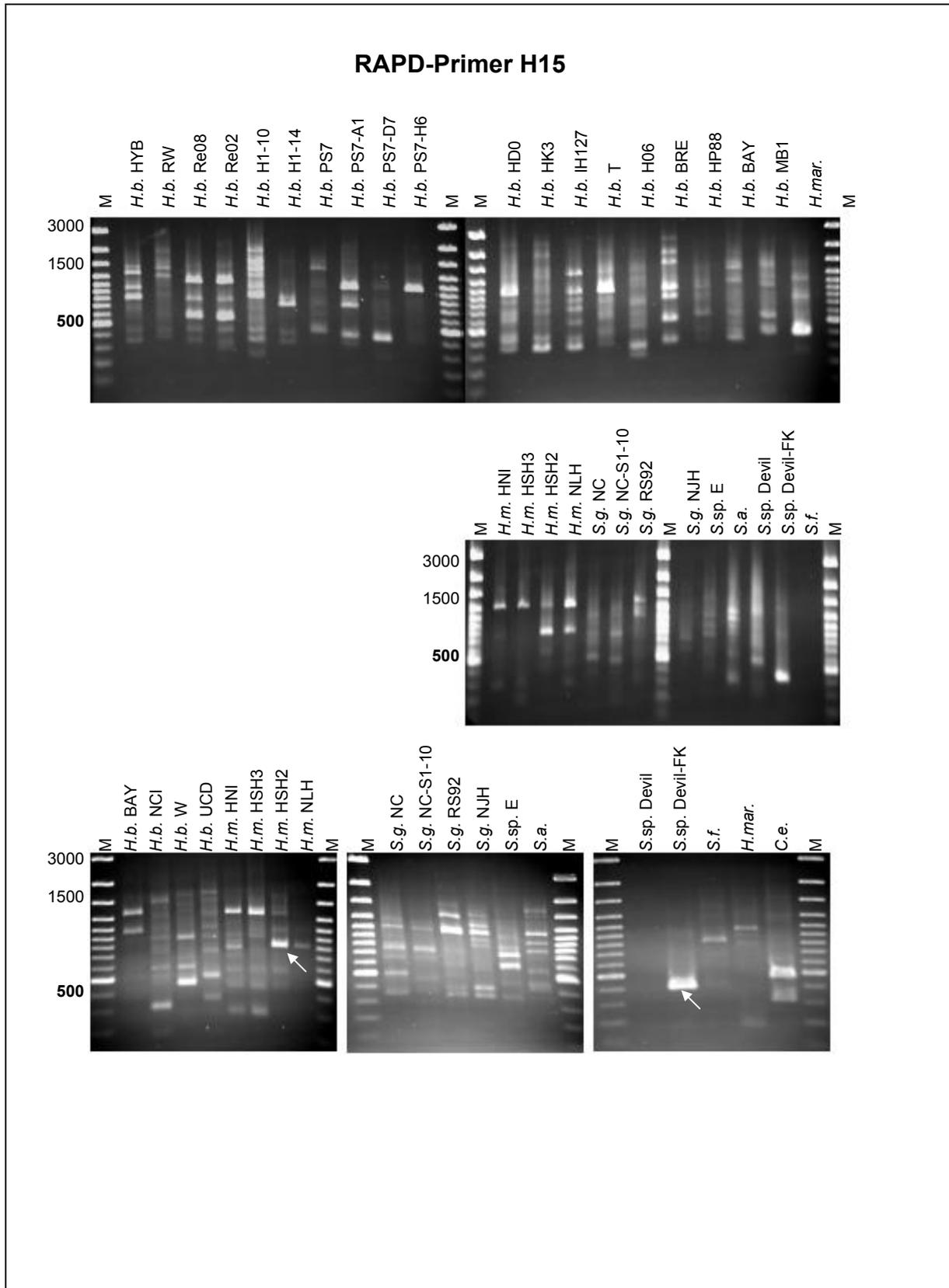


Abb. 8.8. RAPD-PCR-Profil des Primers H15 von 35 Arten bzw. Stämmen/Linien der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema*. Die mit offenen Pfeilen (►) gekennzeichneten Banden sind gattungs- bzw. artspezifisch. Die anderen Pfeile (▶) verweisen auf einige polymorphe Banden innerhalb einer Art. M = Marker (3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp).

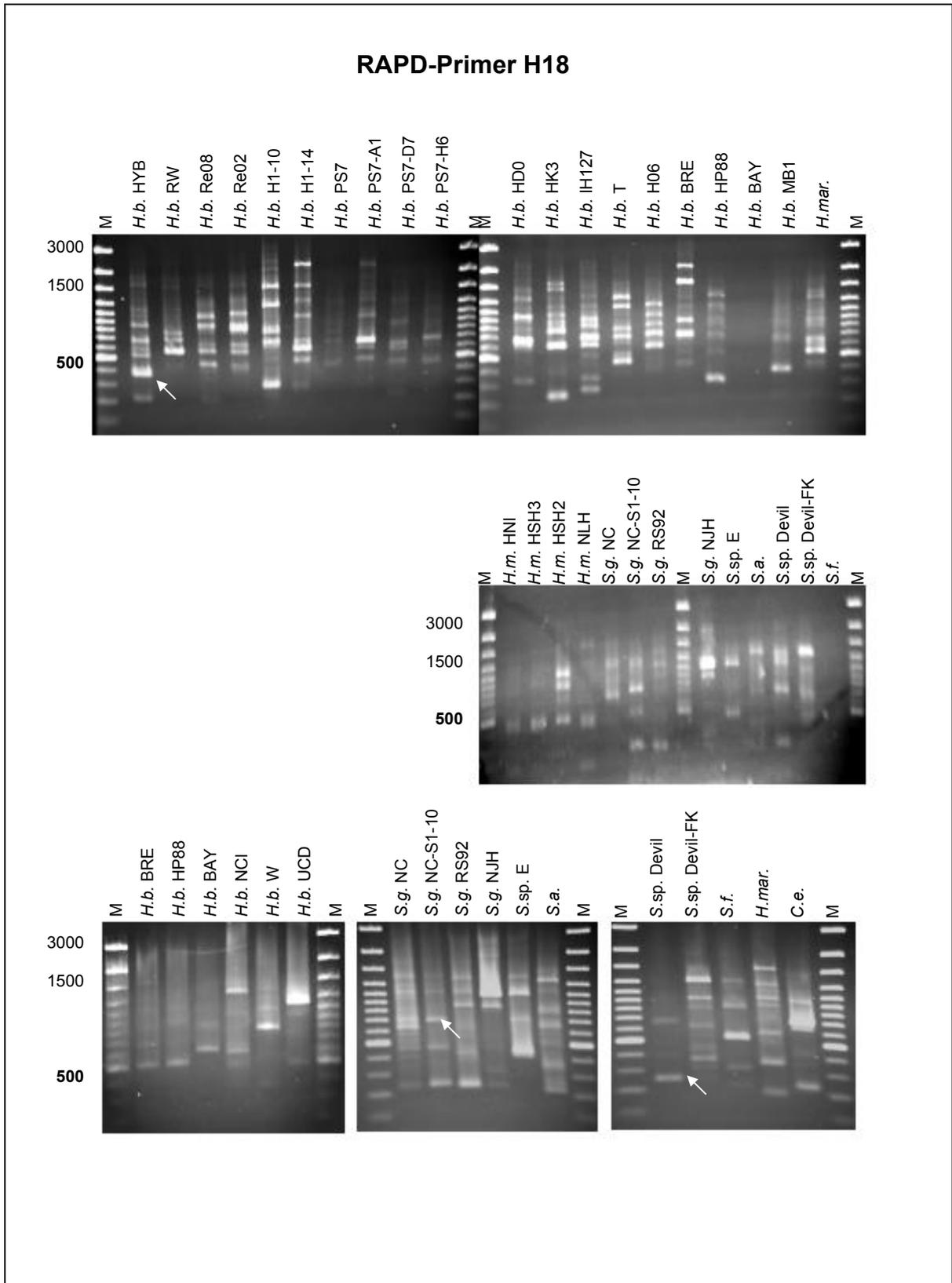


Abb. 8.9. RAPD-PCR-Profil des Primers H18 von 35 Arten bzw. Stämmen/Linien der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema*. Die mit offenen Pfeilen (►) gekennzeichneten Banden sind gattungs- bzw. artspezifisch. Die anderen Pfeile (▶) verweisen auf einige polymorphe Banden innerhalb einer Art. M = Marker (3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp).

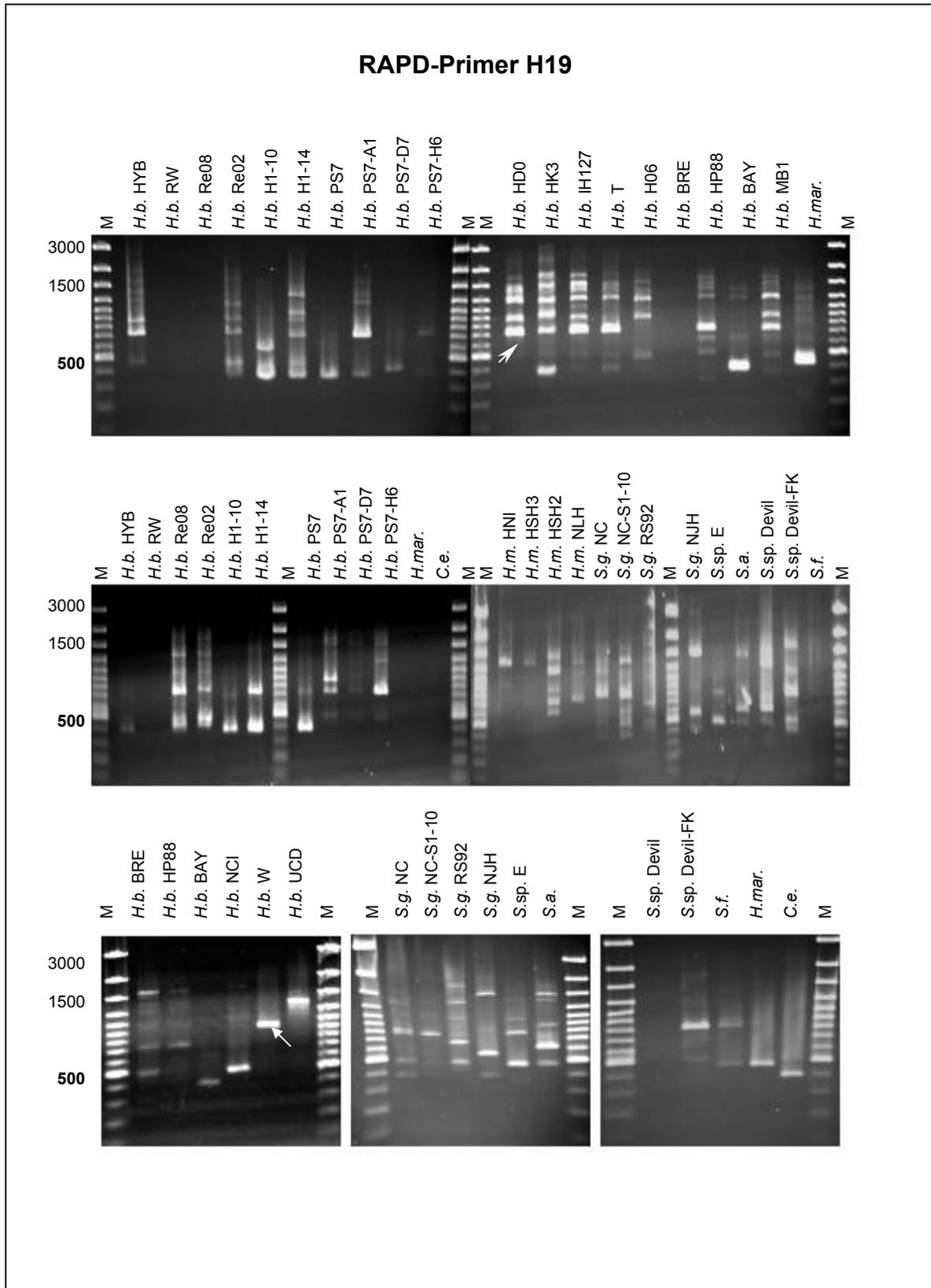


Abb. 8.10. RAPD-PCR-Profil des Primers H19 von 35 Arten bzw. Stämmen/Linien der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema*. Die mit offenen Pfeilen (►) gekennzeichneten Banden sind gattungs- bzw. artspezifisch. Die anderen Pfeile (▶) verweisen auf einige polymorphe Banden innerhalb einer Art. M = Marker (3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp).

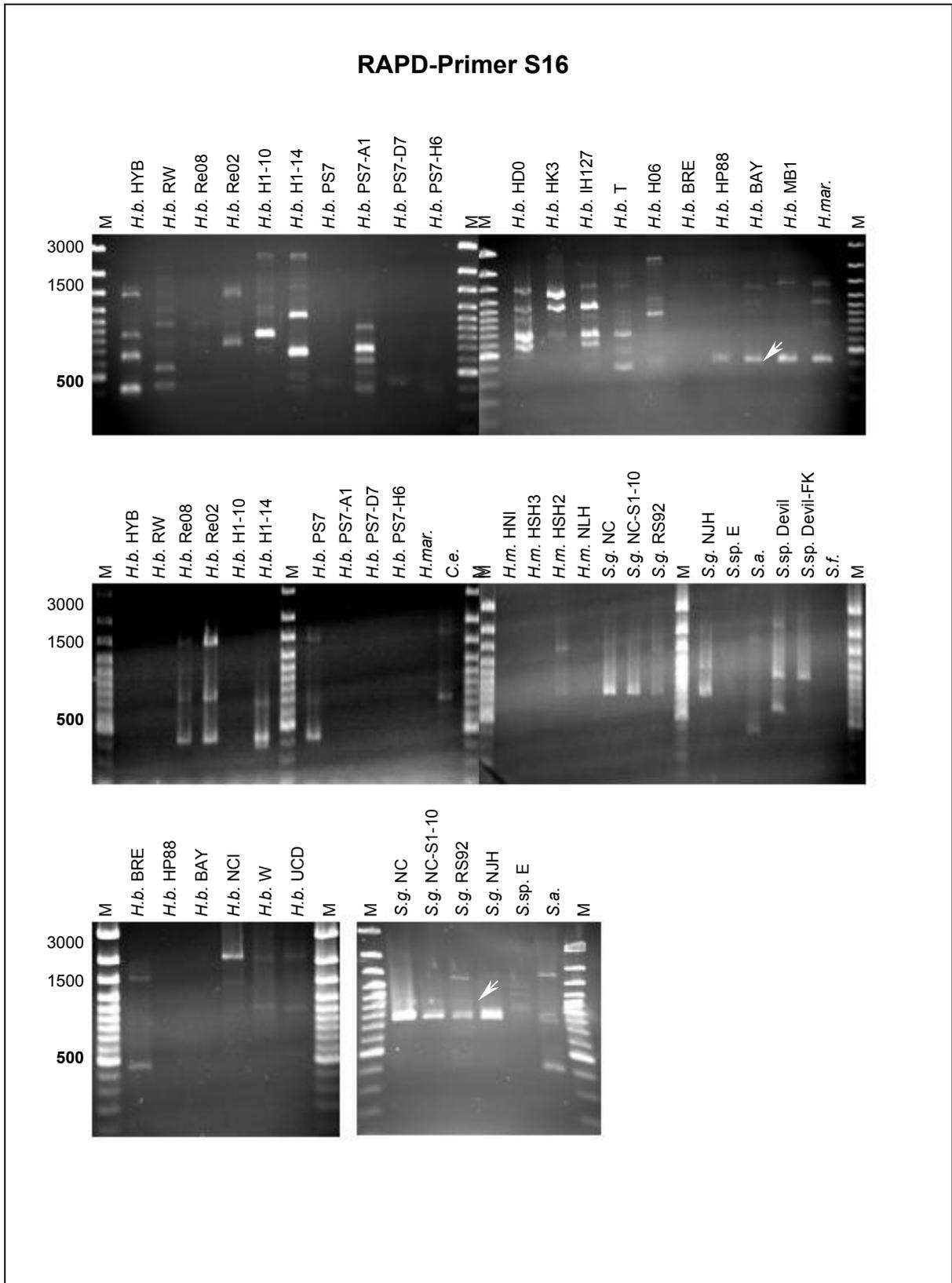


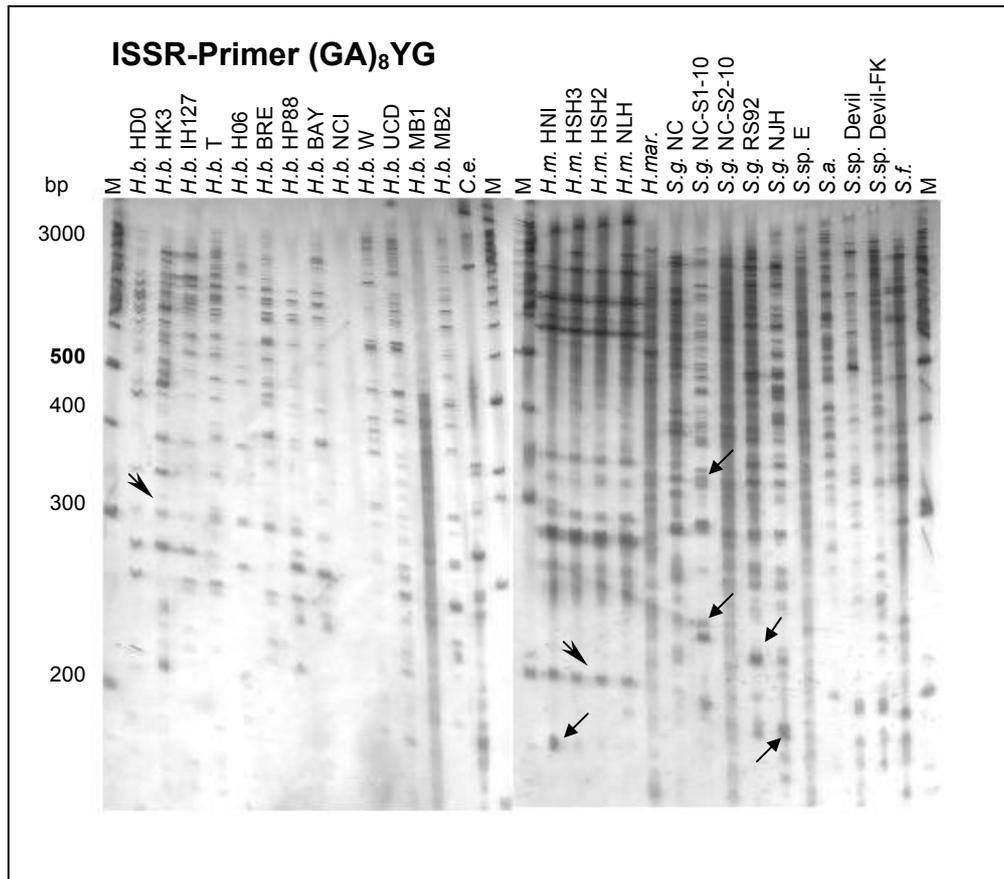
Abb. 8.11. RAPD-PCR-Profil des Primers S16 von 35 Arten bzw. Stämmen/Linien der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema*. Die mit offenen Pfeilen (►) gekennzeichneten Banden sind gattungs- bzw. artspezifisch. Die anderen Pfeile (▶) verweisen auf einige polymorphe Banden innerhalb einer Art. M = Marker (3000, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 bp).

Tab. 8.6. Genetische Distanzen berechnet nach Nei & Li (1979) für die untersuchten Nematoden-Stämme und -Linien bei der RAPD-PCR-Analyse.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37			
1	<i>H.b.</i> HD0	-																																					
2	<i>H.b.</i> HK3	15	-																																				
3	<i>H.b.</i> IH127	25	28	-																																			
4	<i>H.b.</i> T	35	23	36	-																																		
5	<i>H.b.</i> H06	30	29	37	27	-																																	
6	<i>H.b.</i> BRE	43	32	44	21	29	-																																
7	<i>H.b.</i> HP88	40	30	46	21	35	18	-																															
8	<i>H.b.</i> BAY	40	27	39	26	32	27	29	-																														
9	<i>H.b.</i> NCI	71	67	71	70	77	67	69	67	-																													
10	<i>H.b.</i> W	63	62	64	73	70	77	79	79	52	-																												
11	<i>H.b.</i> UCD	51	51	58	61	58	58	61	60	38	43	-																											
12	<i>H.b.</i> MB1	39	34	47	40	52	53	43	48	83	90	72	-																										
13	<i>H.b.</i> HYB	24	20	36	37	36	46	44	33	57	69	51	43	-																									
14	<i>H.b.</i> RW	47	42	52	51	50	49	60	48	50	74	43	50	23	-																								
15	<i>H.b.</i> Re02	42	40	42	40	47	50	48	55	67	79	56	53	43	53	-																							
16	<i>H.b.</i> Re08	41	39	44	39	52	46	43	48	63	77	54	55	45	52	7	-																						
17	<i>H.b.</i> HYB HI-10	38	41	48	42	55	53	55	48	63	77	54	48	16	25	44	40	-																					
18	<i>H.b.</i> HYB HI-14	27	29	41	34	45	47	48	38	60	73	49	47	20	32	35	32	9	-																				
19	<i>H.b.</i> PS7	43	41	52	34	57	43	43	48	57	78	58	41	23	24	42	42	11	22	-																			
20	<i>H.b.</i> PS7-A1	35	34	46	34	41	48	38	51	62	75	61	38	29	47	29	30	32	23	25	-																		
21	<i>H.b.</i> PS7-D7	50	48	58	36	53	48	42	51	64	85	71	47	38	41	31	33	29	35	23	12	-																	
22	<i>H.b.</i> PS7-H6	46	50	58	36	51	50	44	55	64	80	66	39	38	39	34	35	28	30	22	9	7	-																
23	<i>H.mar.</i>	58	61	64	64	69	59	59	68	66	83	66	60	63	64	58	50	57	59	59	64	65	-																
24	<i>H.m.</i> HN1	73	67	79	78	80	75	71	65	70	87	71	84	76	78	73	86	78	83	80	83	86	77	-															
25	<i>H.m.</i> HSH3	63	56	66	60	76	60	58	53	72	84	69	71	61	62	65	64	72	64	66	68	67	70	20	-														
26	<i>H.m.</i> HSH2	47	38	49	44	53	52	48	47	72	87	61	55	50	62	50	52	60	55	52	58	61	65	52	42	-													
27	<i>H.m.</i> NLH	74	70	77	74	81	74	67	66	66	83	73	85	76	81	74	74	87	78	86	82	84	87	85	14	29	56	-											
28	<i>S.g.</i> NC	65	63	68	68	63	66	63	69	77	88	56	78	74	79	65	62	77	68	77	82	79	68	83	80	68	78	-											
29	<i>S.g.</i> NCS1-10	68	66	70	70	67	68	66	70	85	90	65	82	75	78	65	63	77	67	78	79	83	80	71	82	79	72	77	7	-									
30	<i>S.g.</i> RS92	68	67	70	81	67	69	65	70	82	92	73	79	75	80	75	71	78	72	75	74	82	82	65	74	77	75	79	35	36	-								
31	<i>S.g.</i> NJH	69	65	72	77	63	67	64	68	86	90	84	75	75	84	80	74	78	72	77	72	82	80	70	81	83	67	83	44	45	30	-							
32	<i>S.sp.</i> E	75	80	78	81	68	73	80	87	82	88	71	85	83	73	69	67	74	72	78	74	79	78	73	86	92	80	81	60	72	70	-							
33	<i>S.a.</i>	64	59	56	65	50	62	60	66	76	73	70	57	77	73	69	68	76	69	77	52	72	68	66	82	85	69	84	54	58	61	60	65	-					
34	<i>S.sp.</i> Devil	70	70	67	67	63	78	76	80	78	81	76	79	88	82	85	82	89	85	88	87	89	85	76	86	83	73	89	61	66	88	80	79	58	-				
35	<i>S.sp.</i> Devil-FK	82	83	81	84	85	85	83	85	85	92	89	76	86	79	86	81	79	82	76	78	81	76	72	80	82	78	88	73	74	79	85	73	70	49	-			
36	<i>S.f.</i>	93	88	83	97	89	93	93	89	78	95	81	87	88	84	80	77	92	93	94	86	89	89	62	88	97	82	90	70	73	83	83	70	63	81	77	-		
37	<i>C.e.</i>	90	87	88	82	87	87	88	95	98	94	91	89	97	84	82	88	88	85	83	85	86	82	76	76	79	79	79	75	82	84	82	84	82	89	81	100	-	

ISSR-PCR

A



B

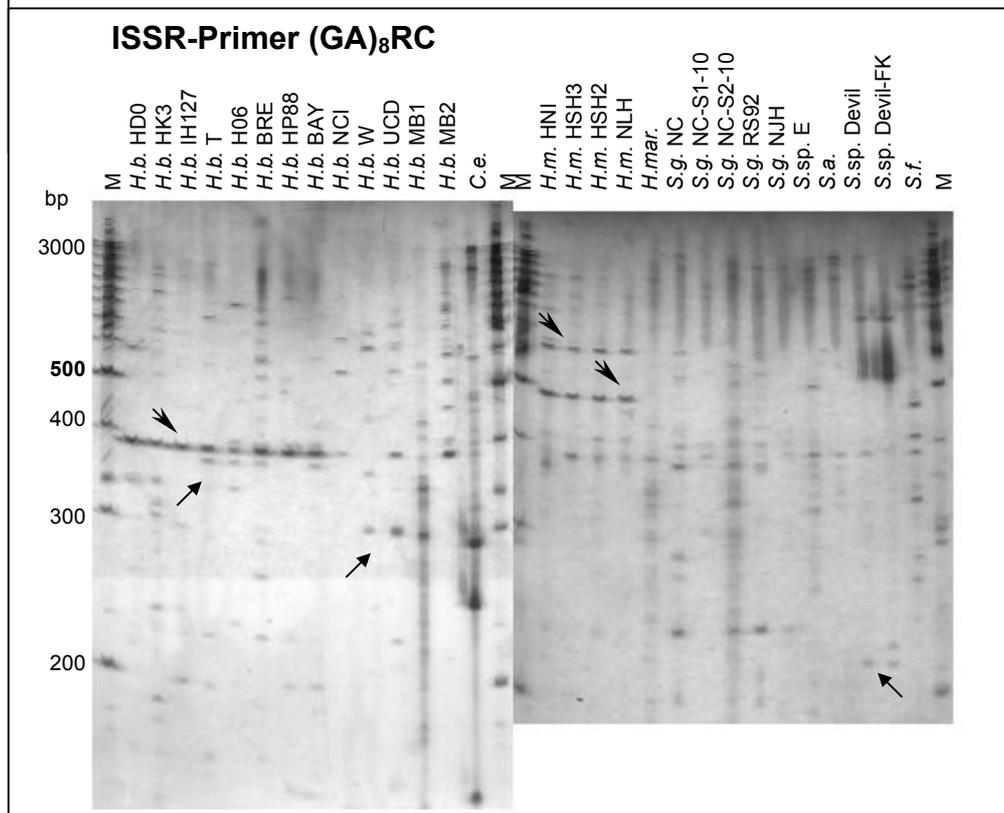


Abb. 8.12. ISSR-PCR-Profil von 29 Arten bzw. Stämmen/Linien der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema*. Die mit offenen Pfeilen (▷) gekennzeichneten Banden sind gattungs- bzw. artspezifisch. Die anderen Pfeile (▶) verweisen auf einige polymorphe Banden innerhalb einer Art. M = Marker. **A.** Primer (GA)₈YG. **B.** Primer (GA)₈RC.

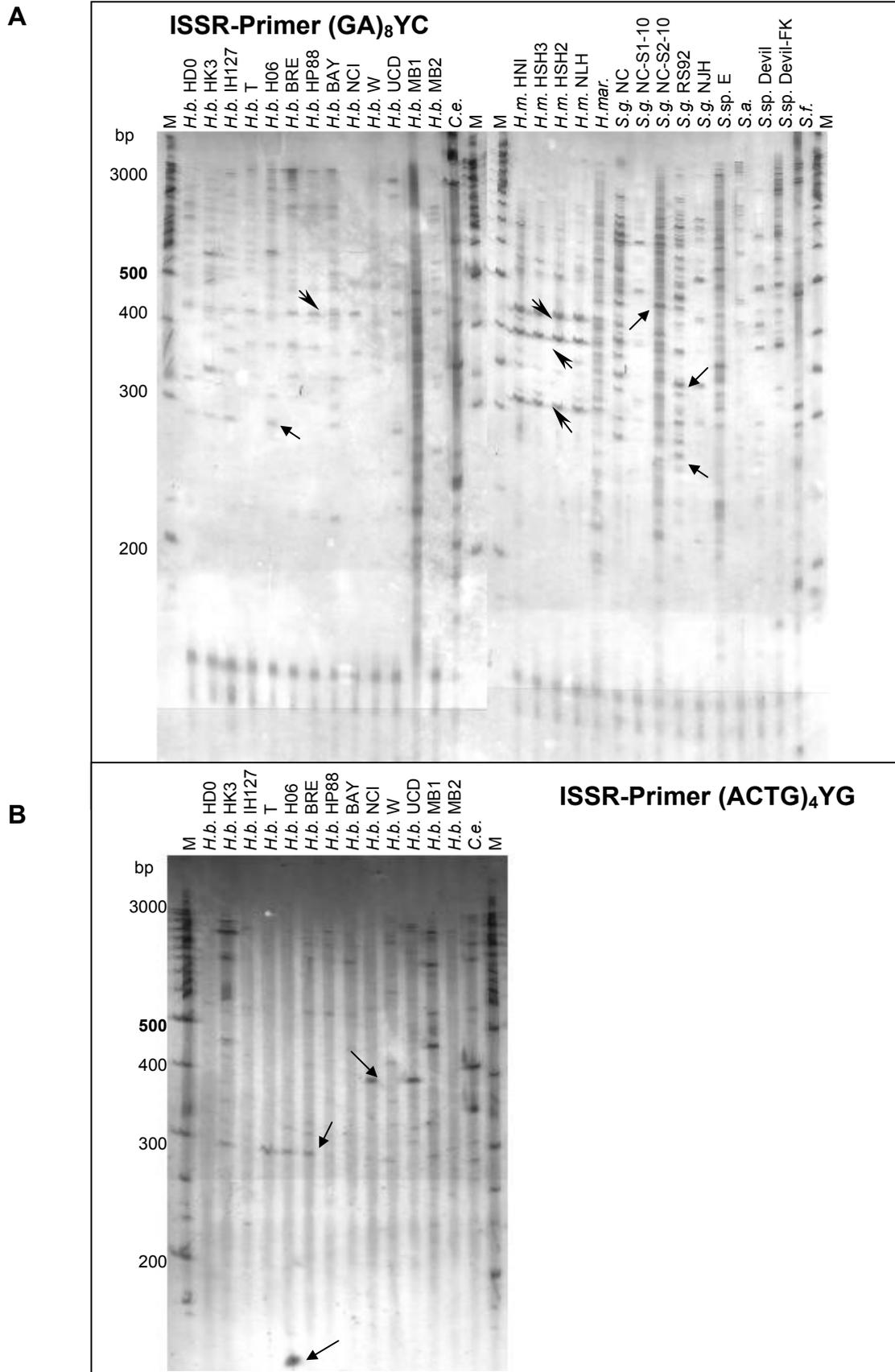


Abb. 8.13. ISSR-PCR-Profil von 29 Arten bzw. Stämmen/Linien der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema*. Die mit offenen Pfeilen (►) gekennzeichneten Banden sind gattungs- bzw. artspezifisch. Die anderen Pfeile (▶) verweisen auf einige polymorphe Banden innerhalb einer Art. M = Marker. **A.** Primer (GA)₈YC. **B.** Primer (ACTG)₄YG.

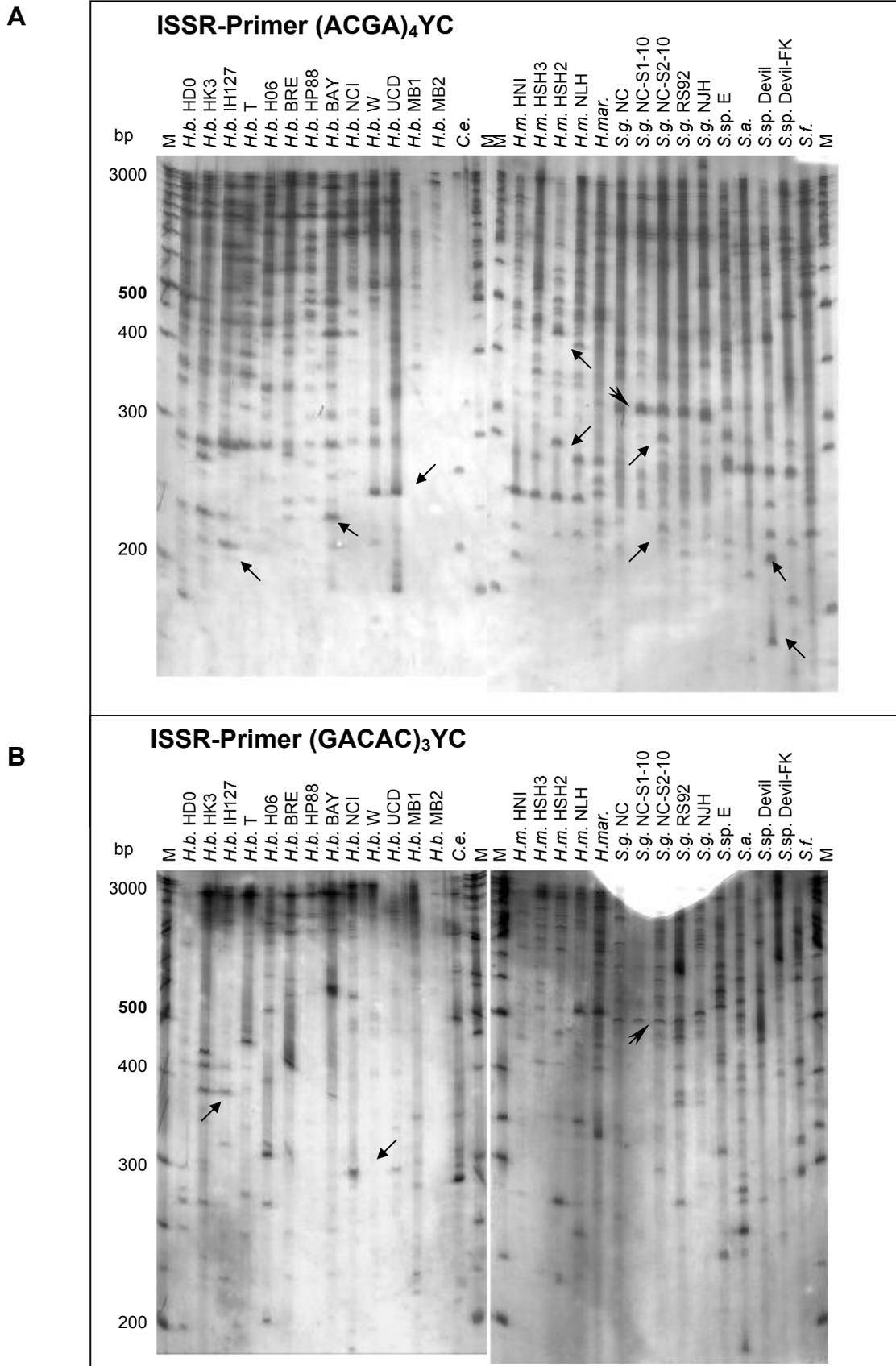


Abb. 8.14. ISSR-PCR-Profil von 29 Arten bzw. Stämmen/Linien der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema*. Die mit offenen Pfeilen (▷) gekennzeichneten Banden sind gattungsspezifisch. Die anderen Pfeile (▶) verweisen auf einige polymorphe Banden innerhalb einer Art. M = Marker. **A.** Primer (ACGA)₄YC. **B.** Primer (GACAC)₃YC.

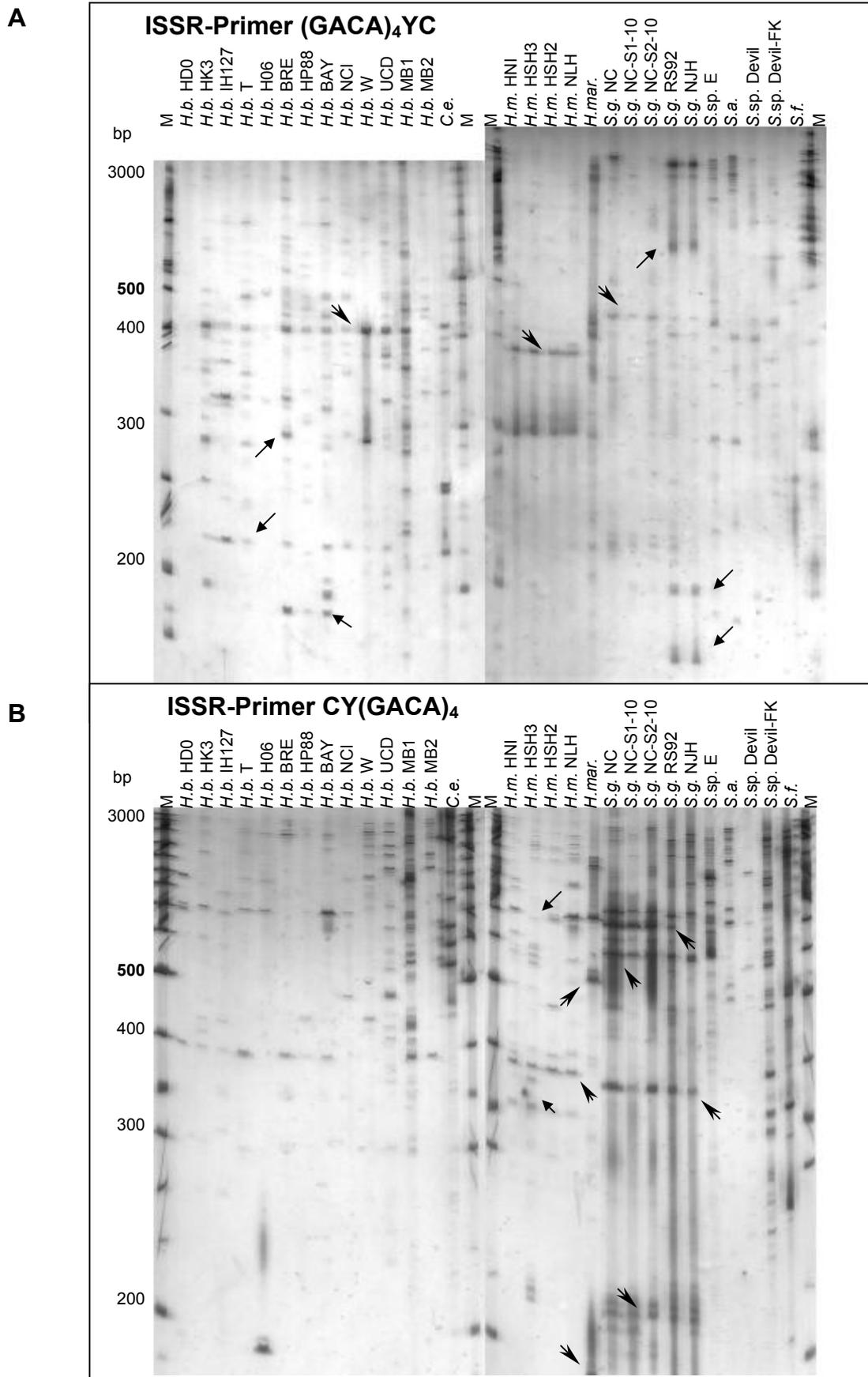


Abb. 8.15. ISSR-PCR-Profil von 29 Arten bzw. Stämmen/Linien der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema*. Die mit offenen Pfeilen (▶) gekennzeichneten Banden sind gattungsspezifisch. Die anderen Pfeile (►) verweisen auf einige polymorphe Banden innerhalb einer Art. M = Marker. **A.** Primer (GACA)₄YC. **B.** Primer CY(GACA)₄.

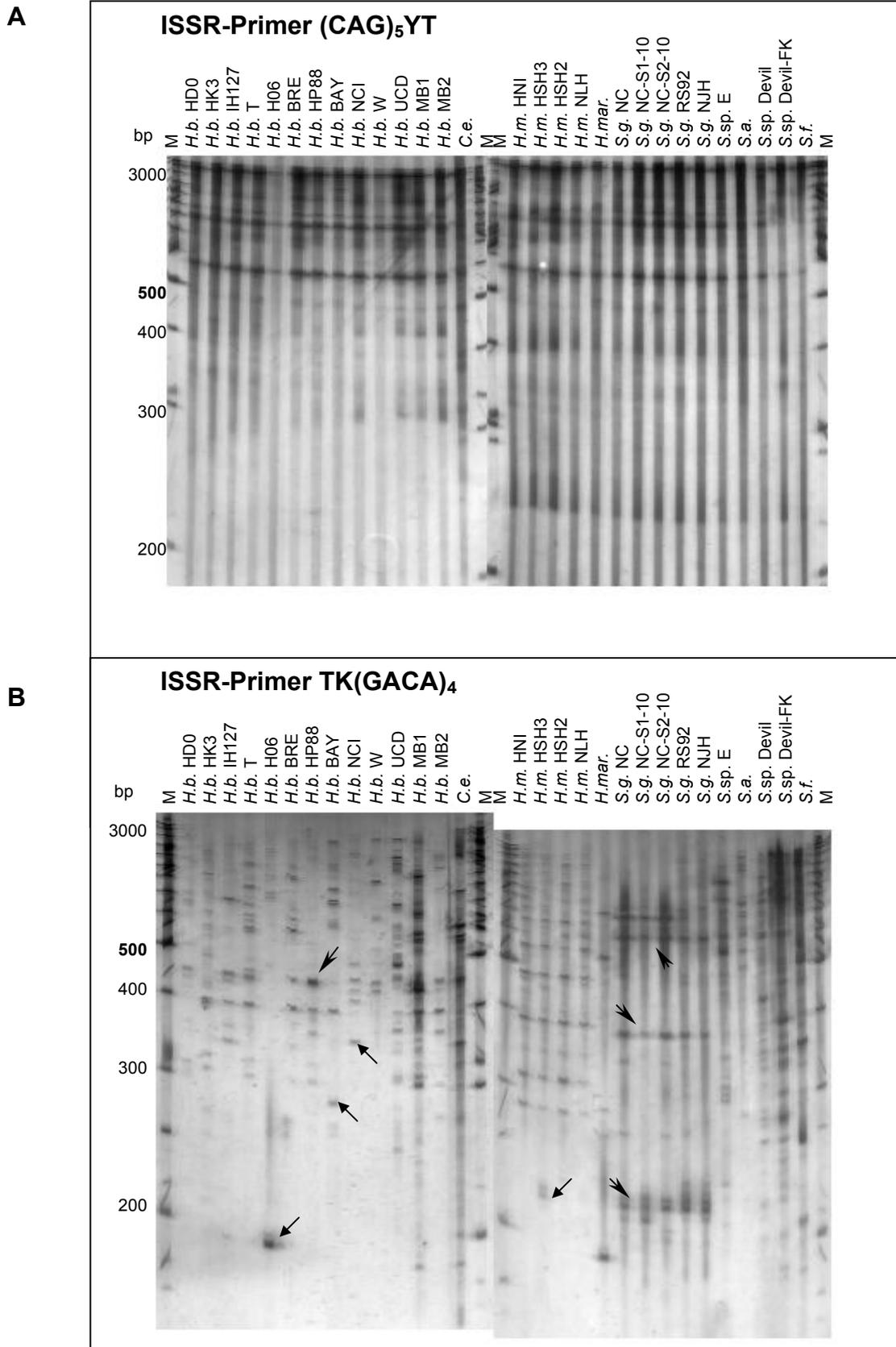


Abb. 8.16. ISSR-PCR-Profil von 29 Arten bzw. Stämmen/Linien der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema*. Die mit offenen Pfeilen (▶) gekennzeichneten Banden sind gattungs- bzw. artspezifisch. Die anderen Pfeile (▲) verweisen auf einige polymorphe Banden innerhalb einer Art. M = Marker. **A.** Primer (CAG)₅YT. Dieser Primer erzeugte selbst zwischen den Arten kaum polymorphe Banden. **B.** Primer TK(GACA)₄.

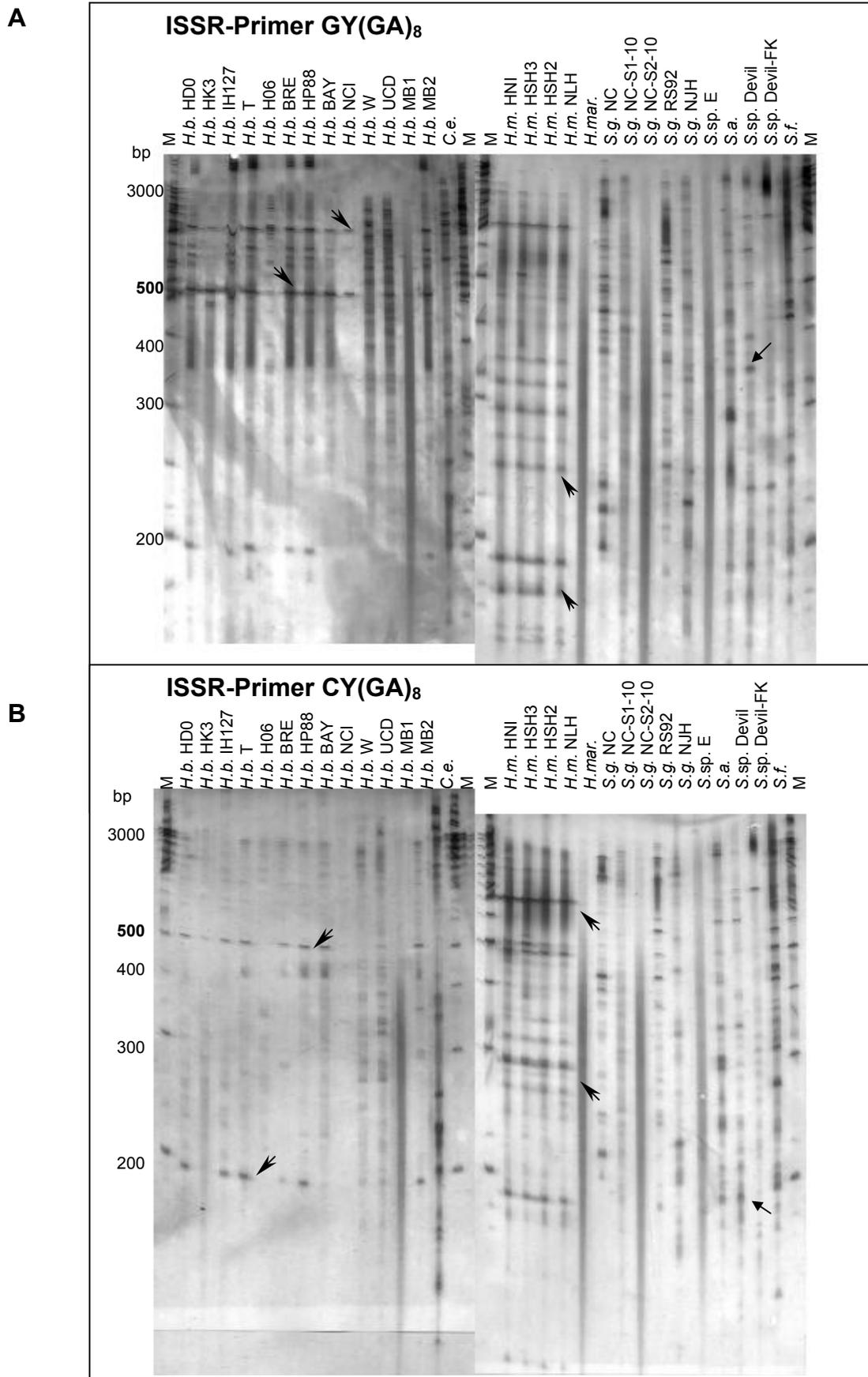


Abb. 8.17. ISSR-PCR-Profil von 29 Arten bzw. Stämmen/Linien der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema*. Die mit offenen Pfeilen (►) gekennzeichneten Banden sind gattungs- bzw. artspezifisch. Die anderen Pfeile (▶) verweisen auf einige polymorphe Banden innerhalb einer Art. M = Marker. **A.** Primer GY(GA)₈. **B.** Primer CY(GA)₈.

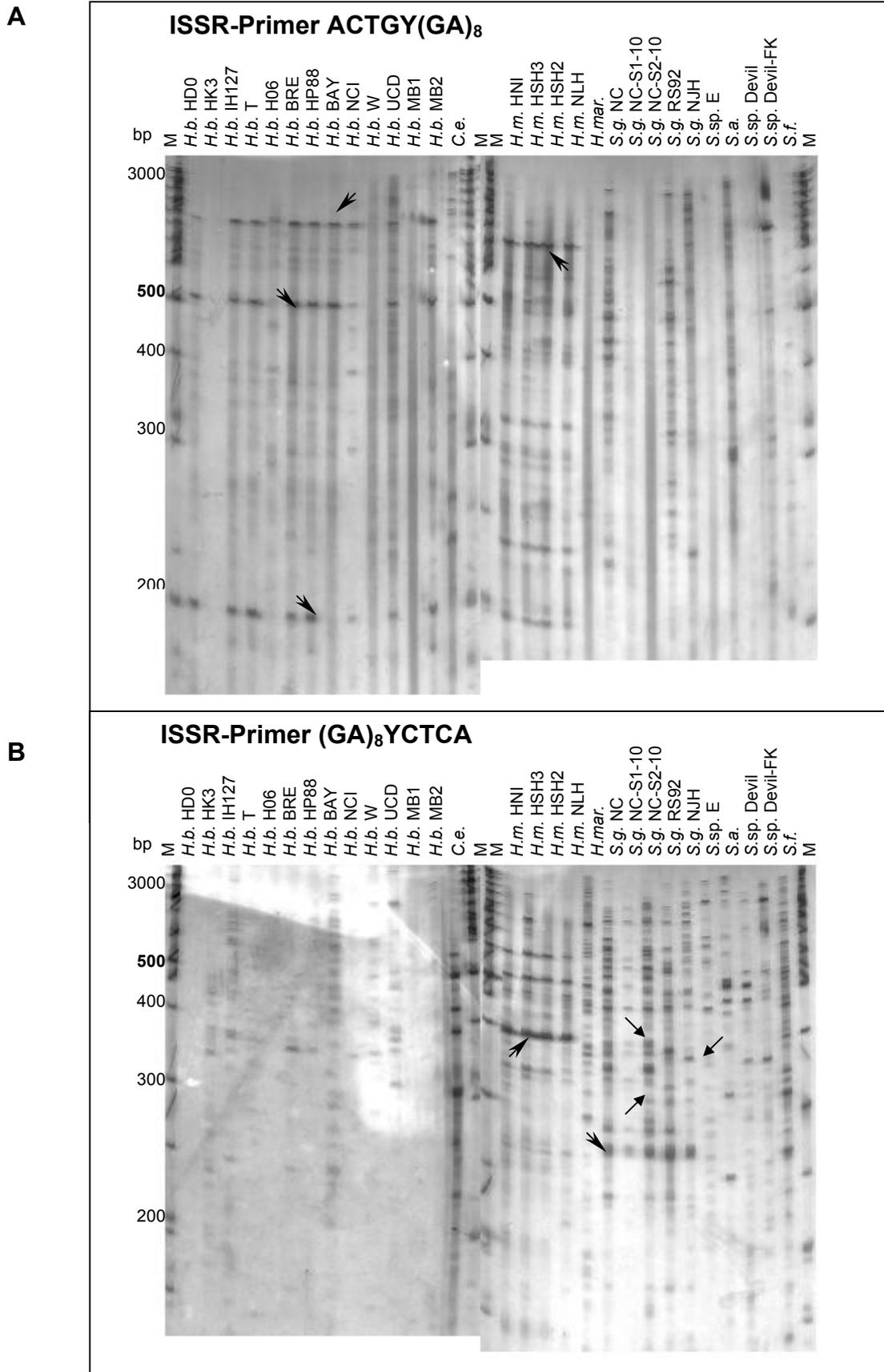


Abb. 8.18. ISSR-PCR-Profil von 29 Arten bzw. Stämmen/Linien der Gattungen *Heterorhabditis* und *Steinernema*. Die mit offenen Pfeilen (▶) gekennzeichneten Banden sind gattungs- bzw. artspezifisch. Die anderen Pfeile (►) verweisen auf einige polymorphe Banden innerhalb einer Art. M = Marker. **A.** Primer ACTGY(GA)₈. **B.** Primer (GA)₈YCTCA.

Tab. 8.7. Genetische Distanzen berechnet nach Nei & Li (1979) für die untersuchten Nematoden-Stämme und -Linien (außer den Inzuchtlinien) bei der ISSR-PCR-Analyse.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36		
1 <i>H.b.</i> HD0	-																																					
2 <i>H.b.</i> HK3	40	-																																				
3 <i>H.b.</i> IH127	25	37	-																																			
4 <i>H.b.</i> T	28	36	27	-																																		
5 <i>H.b.</i> H06	51	53	57	47	-																																	
6 <i>H.b.</i> BRE	27	37	21	19	52	-																																
7 <i>H.b.</i> HP88	33	40	32	27	59	18	-																															
8 <i>H.b.</i> BAY	36	32	32	36	56	25	35	-																														
9 <i>H.b.</i> NCI	51	62	47	47	59	50	49	51	-																													
10 <i>H.b.</i> W	58	66	56	59	77	54	53	60	64	-																												
11 <i>H.b.</i> UCD	48	46	36	41	84	42	43	47	49	46	-																											
12 <i>H.b.</i> MB1	58	50	58	65	71	61	56	58	66	54	64	-																										
13 <i>H.b.</i> MB2	26	52	33	32	85	29	27	38	54	56	45	52	-																									
14 <i>H.b.</i> HYB	40	41	39	43	66	42	40	42	55	61	51	57	40	-																								
15 <i>H.b.</i> RW	46	47	46	47	68	44	43	46	63	83	53	56	43	23	-																							
16 <i>H.b.</i> Re02	49	48	46	48	66	49	54	43	56	59	56	61	54	41	41	-																						
17 <i>H.b.</i> Re08	53	49	50	50	64	51	56	51	53	56	52	62	58	47	47	13	-																					
18 <i>H.b.</i> HYBH1-10	45	41	45	46	58	44	48	44	63	53	58	61	51	27	35	28	39	-																				
19 <i>H.b.</i> HYBH1-14	42	40	40	42	56	42	47	40	56	64	56	62	47	30	33	27	37	11	-																			
20 <i>H.b.</i> PS7	44	35	38	38	59	38	44	40	55	60	50	53	46	27	33	36	43	33	28	-																		
21 <i>H.mar.</i>	72	70	71	72	75	72	72	75	72	74	76	73	81	76	75	72	69	74	74	70	-																	
22 <i>H.m.</i> HN1	69	71	74	71	76	73	75	73	76	74	75	77	74	71	74	71	71	76	71	69	64	-																
23 <i>H.m.</i> HSH3	74	76	79	74	79	76	76	77	77	76	74	81	77	74	77	79	74	79	78	74	68	15	-															
24 <i>H.m.</i> HSH2	71	73	75	75	78	76	77	76	78	74	74	76	77	72	73	75	73	77	75	71	65	8	14	-														
25 <i>H.m.</i> NLH	71	73	77	73	73	76	75	74	73	74	72	77	76	74	77	77	73	80	76	73	65	8	11	7	-													
26 <i>S.g.</i> NC	85	86	83	83	85	83	84	81	83	87	84	90	83	87	86	83	84	87	85	83	85	88	88	91	90	-												
27 <i>S.g.</i> NC S1-10	88	89	85	86	85	87	86	86	83	88	86	89	86	90	88	88	88	90	90	88	83	91	89	91	91	32	-											
28 <i>S.g.</i> NC S2-10	87	87	85	86	85	85	86	84	83	88	84	89	85	87	88	82	84	86	84	83	83	89	88	92	90	22	23	-										
29 <i>S.g.</i> RS92	85	86	82	86	87	85	87	84	87	89	87	93	86	87	87	84	87	86	85	83	86	87	88	89	89	22	43	32	-									
30 <i>S.g.</i> NJH	88	90	87	90	89	88	86	88	87	88	86	91	87	89	90	88	88	86	88	89	91	88	87	89	87	39	44	37	31	-								
31 <i>S.sp.</i> E	87	85	88	84	82	88	89	82	82	85	88	87	89	89	88	80	81	86	83	85	87	85	90	89	87	63	62	59	67	60	-							
32 <i>S.a.</i>	80	85	83	82	83	84	85	84	83	83	85	85	85	85	85	82	83	85	83	84	84	81	86	84	82	71	72	74	66	69	67	-						
33 <i>S.sp.</i> Devil	81	83	83	84	84	86	85	84	80	85	87	86	86	85	82	82	83	84	83	82	88	85	89	86	86	70	78	72	65	68	62	41	-					
34 <i>S.sp.</i> Devil-FK	83	83	86	84	87	88	88	86	85	85	88	85	91	85	82	80	83	82	82	82	87	86	90	89	89	72	80	73	72	67	61	34	-					
35 <i>S.f.</i>	83	85	81	83	91	82	81	86	85	80	81	89	85	85	84	82	83	81	82	84	85	84	86	86	86	74	79	69	73	72	59	55	61	-				
36 <i>C.e.</i>	82	83	82	80	86	79	78	81	86	71	80	74	78	84	84	84	86	82	82	84	83	86	86	83	85	85	84	85	87	84	87	86	86	87	83	-		

ISSR-PCR (Inzuchtlinien)

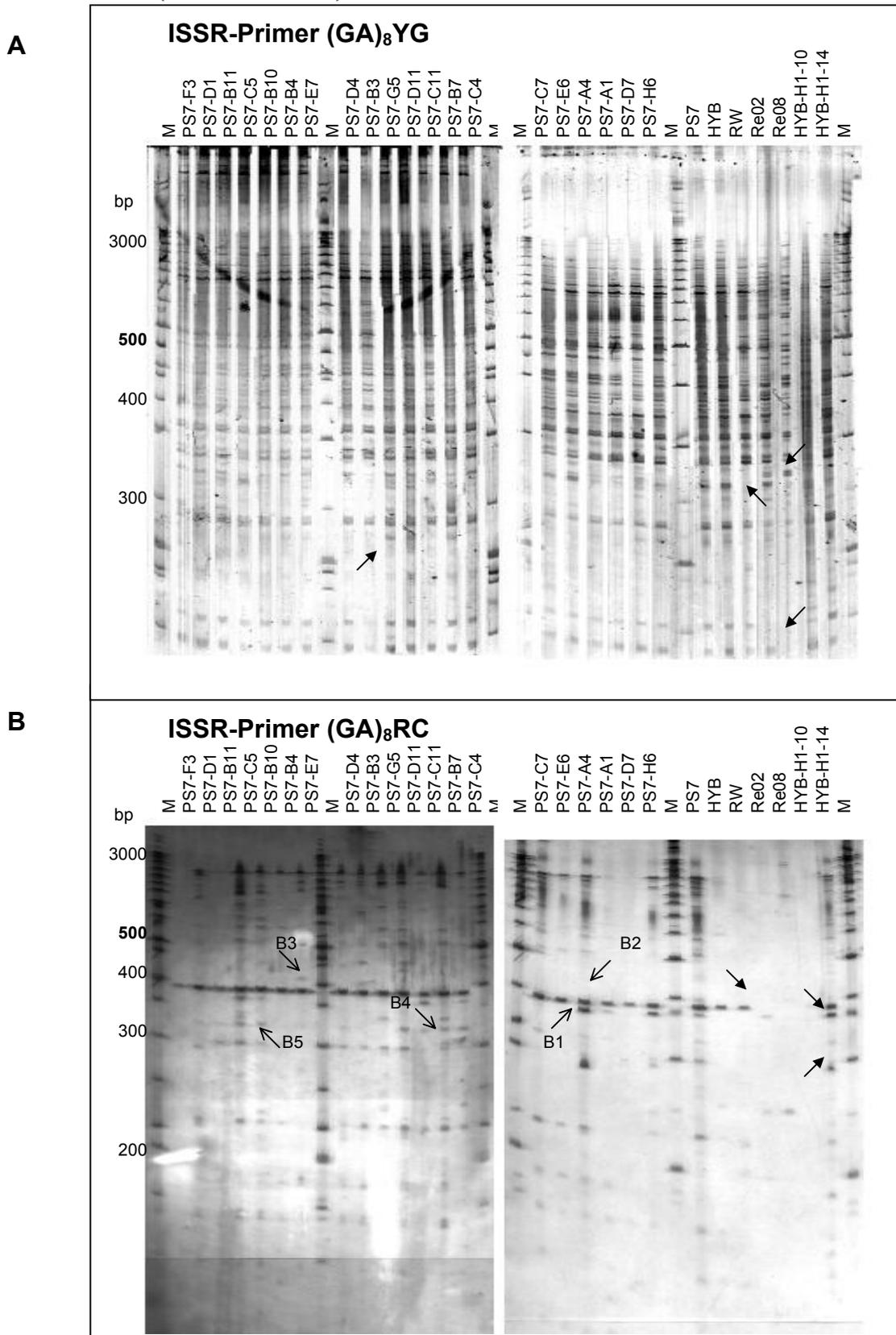


Abb. 8.19. ISSR-PCR-Profil von 20 Inzuchtlinien und dem Ausgangsstamm *H. bacteriophora* PS7 sowie des kommerziellen *H. bacteriophora*-Hybrids HYB, dessen Re-Isolaten (RW, Re02, Re08) und Selektionslinie (HYB-H1-10 bzw. HYB-H1-14). Die mit offenen Pfeilen (>) gekennzeichneten Banden wurden sequenziert. B1-B4 = Nummerierung der sequenzierten Banden. Die anderen Pfeile (▶) verweisen auf einige polymorphe Banden. M = Marker. **A.** Primer (GA)₈YG. **B.** Primer (GA)₈RC.

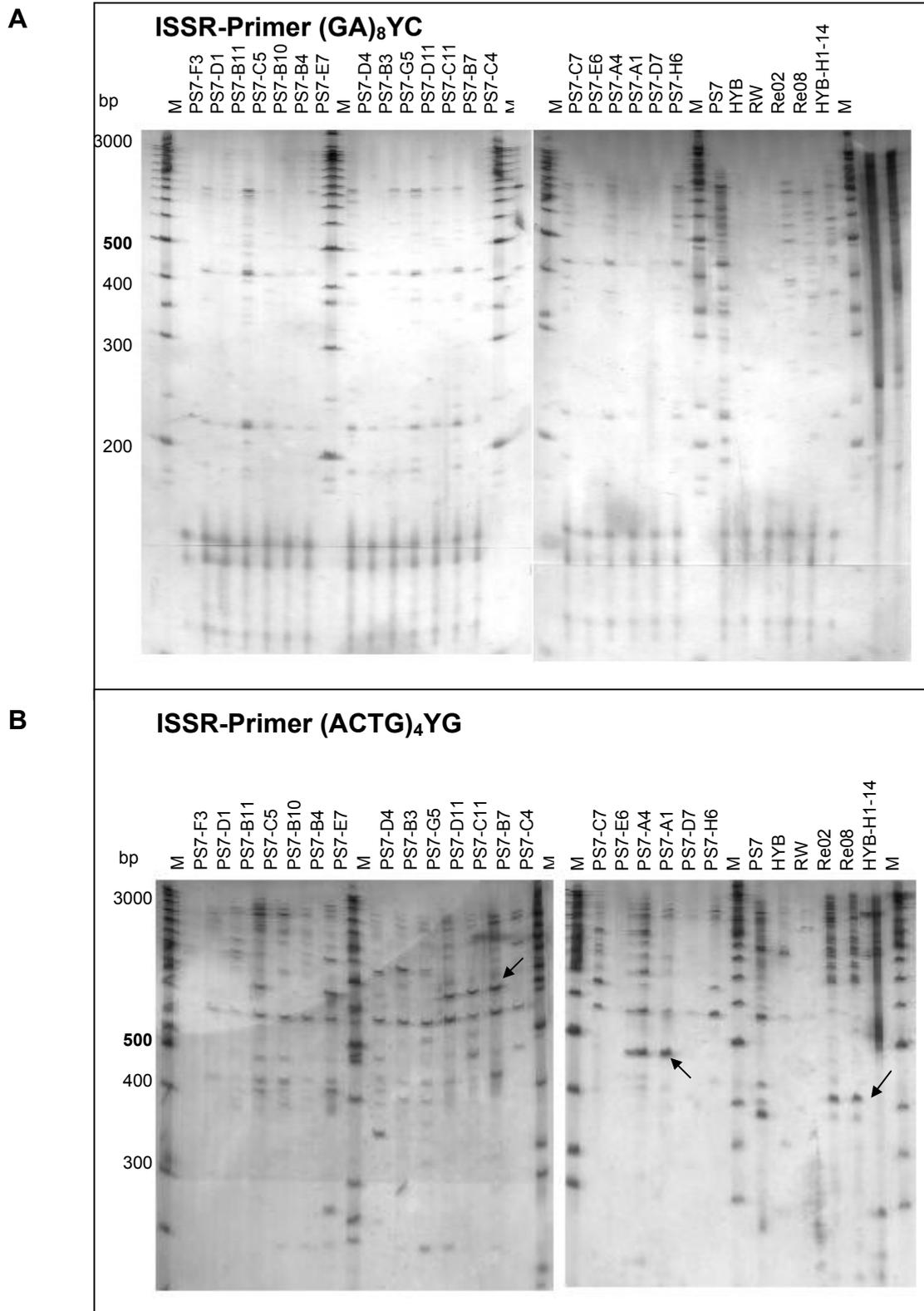


Abb. 8.20. ISSR-PCR-Profil von 20 Inzuchtlinien und dem Ausgangsstamm *H. bacteriophora* PS7 sowie des kommerziellen *H. bacteriophora*-Hybrids HYB, dessen Re-Isolaten (RW, Re02, Re08) und Selektionslinie (HYB-H1-14). Die Pfeile (►) verweisen auf einige polymorphe Banden. M = Marker. **A.** Primer (GA)₈YC. **B.** Primer (ACTG)₄YG.

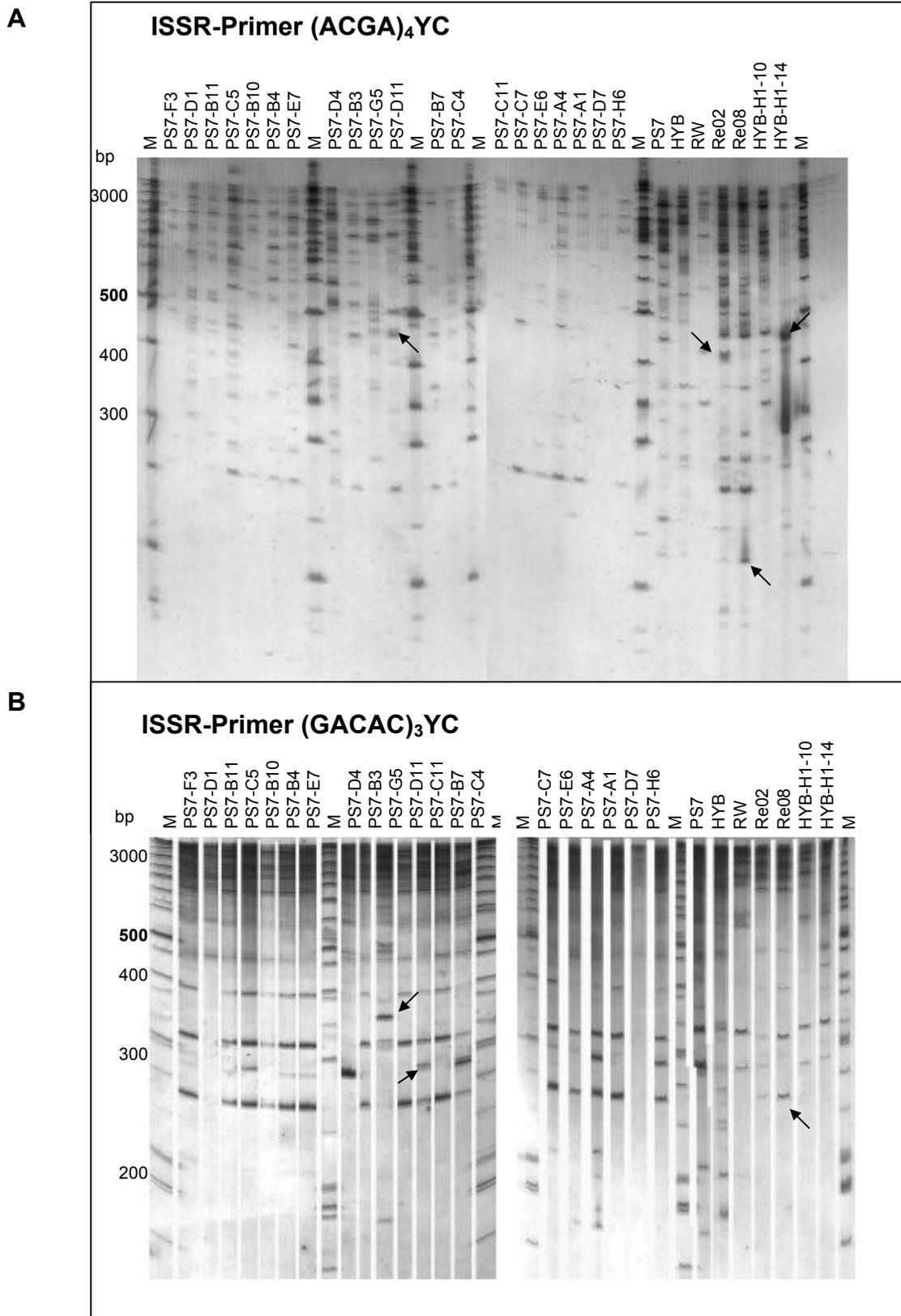


Abb. 8.21. ISSR-PCR-Profil von 20 Inzuchtlinien und dem Ausgangsstamm *H. bacteriophora* PS7 sowie des kommerziellen *H. bacteriophora*-Hybrids HYB, dessen Re-Isolaten (RW, Re02, Re08) und Selektionslinie (HYB-H1-10 bzw. HYB-H1-14). Die Pfeile (►) verweisen auf einige polymorphe Banden. M = Marker. **A.** Primer (ACGA)₄YC. **B.** Primer (GACAC)₃YC.

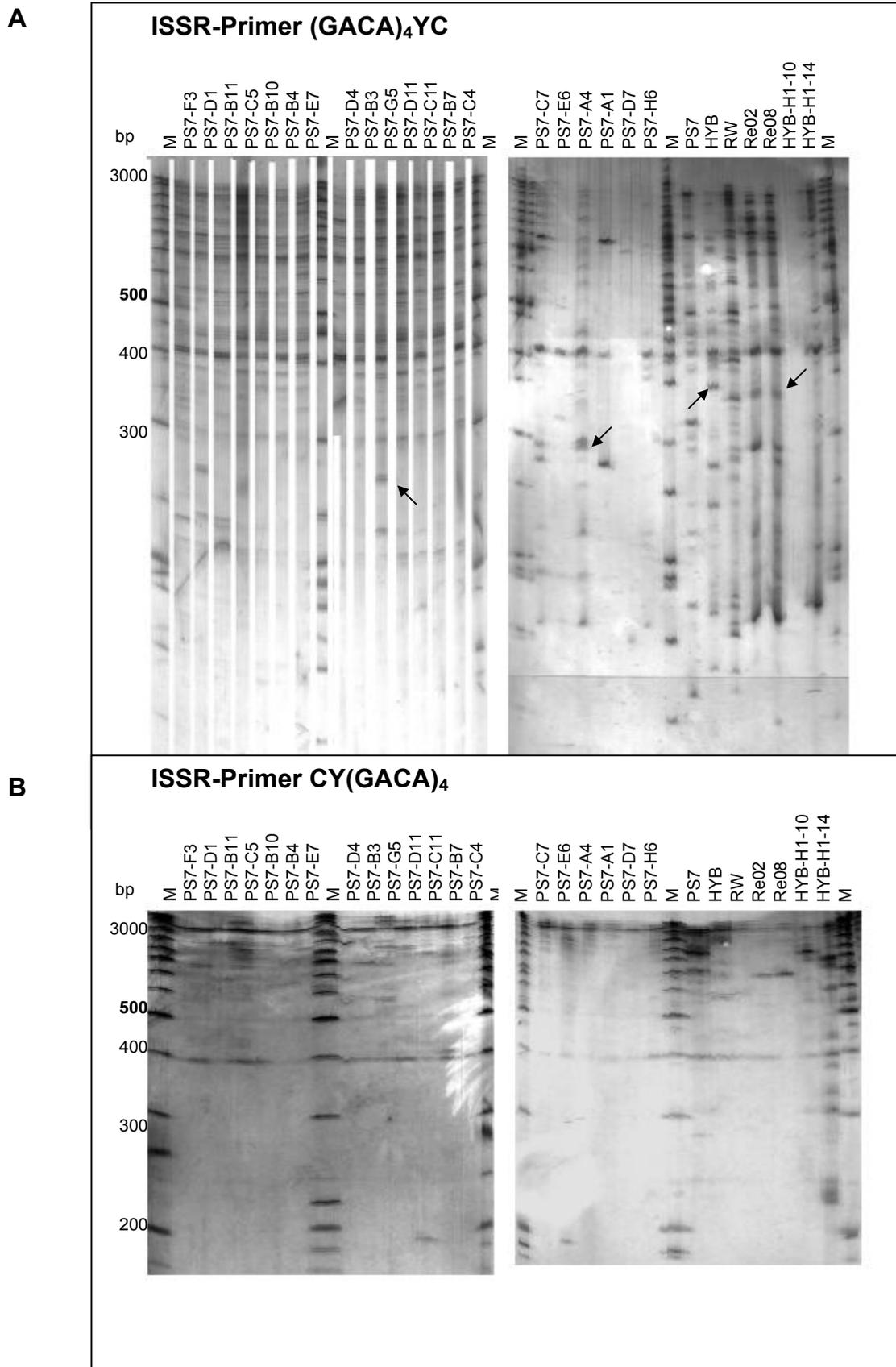


Abb. 8.22. ISSR-PCR-Profil von 20 Inzuchtlinien und dem Ausgangsstamm *H. bacteriophora* PS7 sowie des kommerziellen *H. bacteriophora*-Hybrids HYB, dessen Re-Isolaten (RW, Re02, Re08) und Selektionslinie (HYB-H1-10 bzw. HYB-H1-14). Die Pfeile (►) verweisen auf einige polymorphe Banden. M = Marker. **A.** Primer (GACA)₄YC. **B.** Primer CY(GACA)₄.

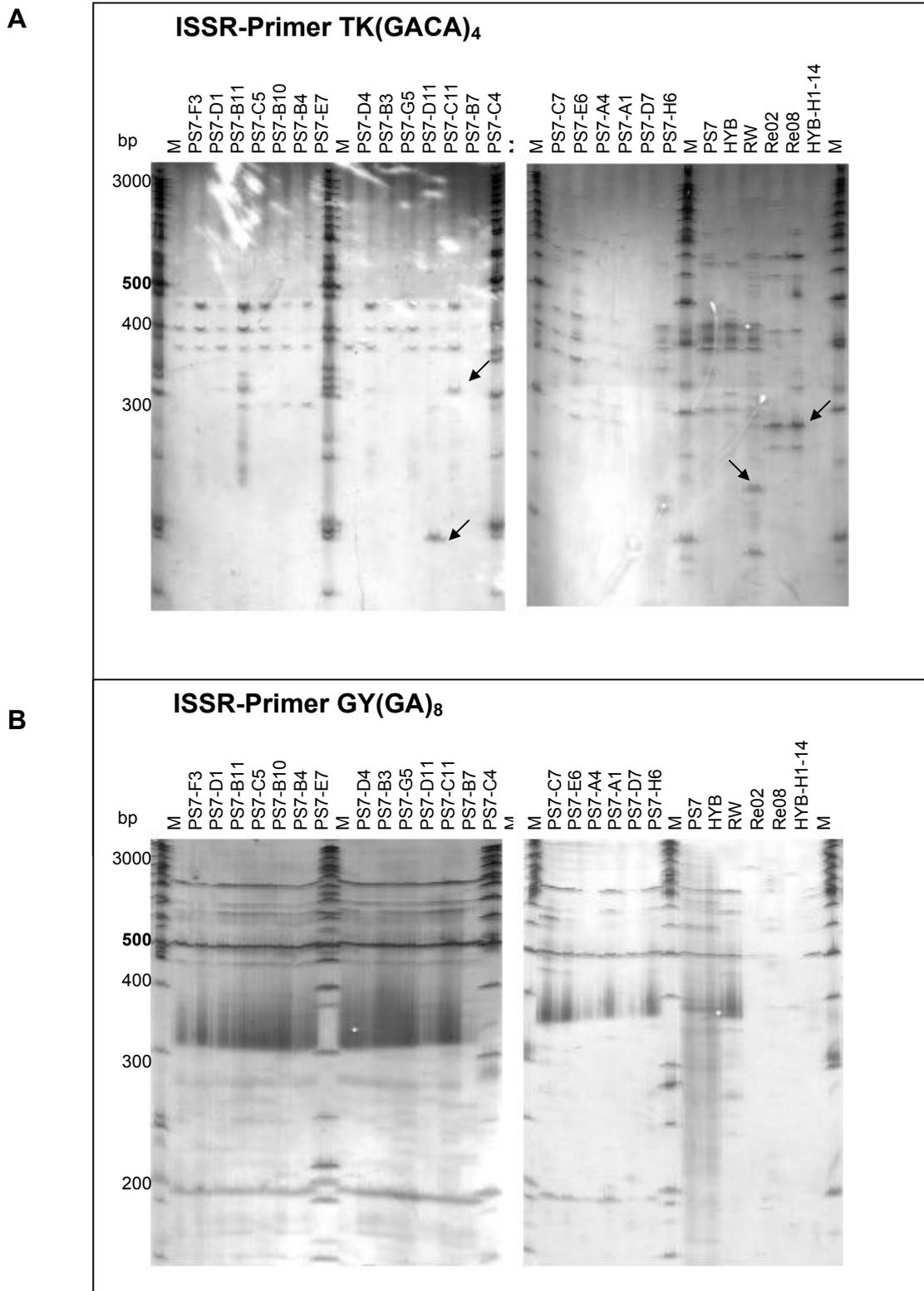


Abb. 8.23. ISSR-PCR-Profil von 20 Inzuchtlinien und dem Ausgangsstamm *H. bacteriophora* PS7 sowie des kommerziellen *H. bacteriophora*-Hybrids HYB, dessen Re-Isolaten (RW, Re02, Re08) und Selektionslinie (HYB-H1-14). Die Pfeile (►) verweisen auf einige polymorphe Banden. M = Marker. **A.** Primer TK(GACA)₄. **B.** Primer GY(GA)₈.

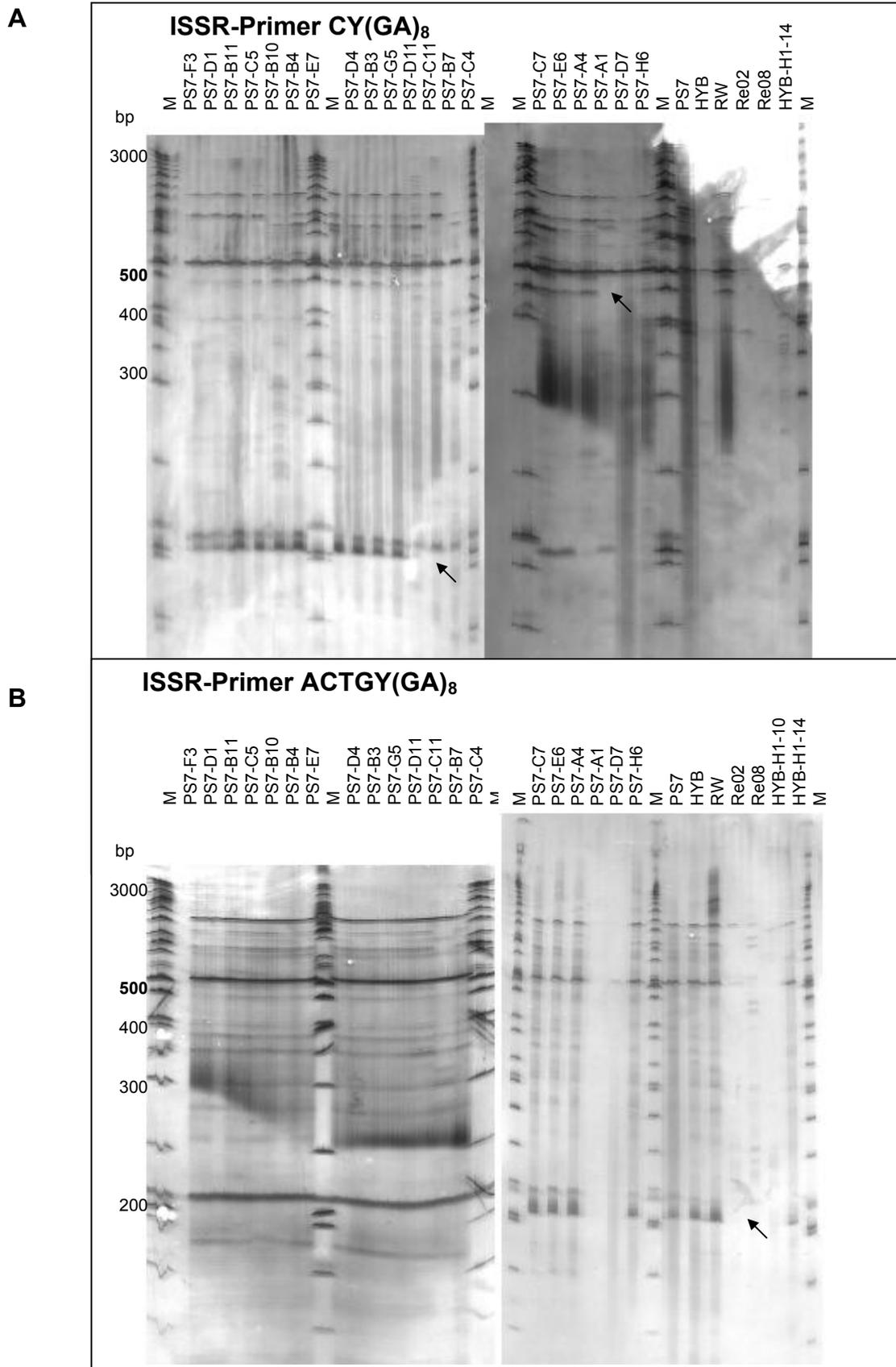


Abb. 8.24. ISSR-PCR-Profil von 20 Inzuchtlinien und dem Ausgangsstamm *H. bacteriophora* PS7 sowie des kommerziellen *H. bacteriophora*-Hybrids HYB, dessen Re-Isolaten (RW, Re02, Re08) und Selektionslinie (HYB-H1-10 bzw. HYB-H1-14). Die Pfeile (►) verweisen auf einige polymorphe Banden. M = Marker. **A.** Primer CY(GA)₈. **B.** Primer ACTGY(GA)₈.

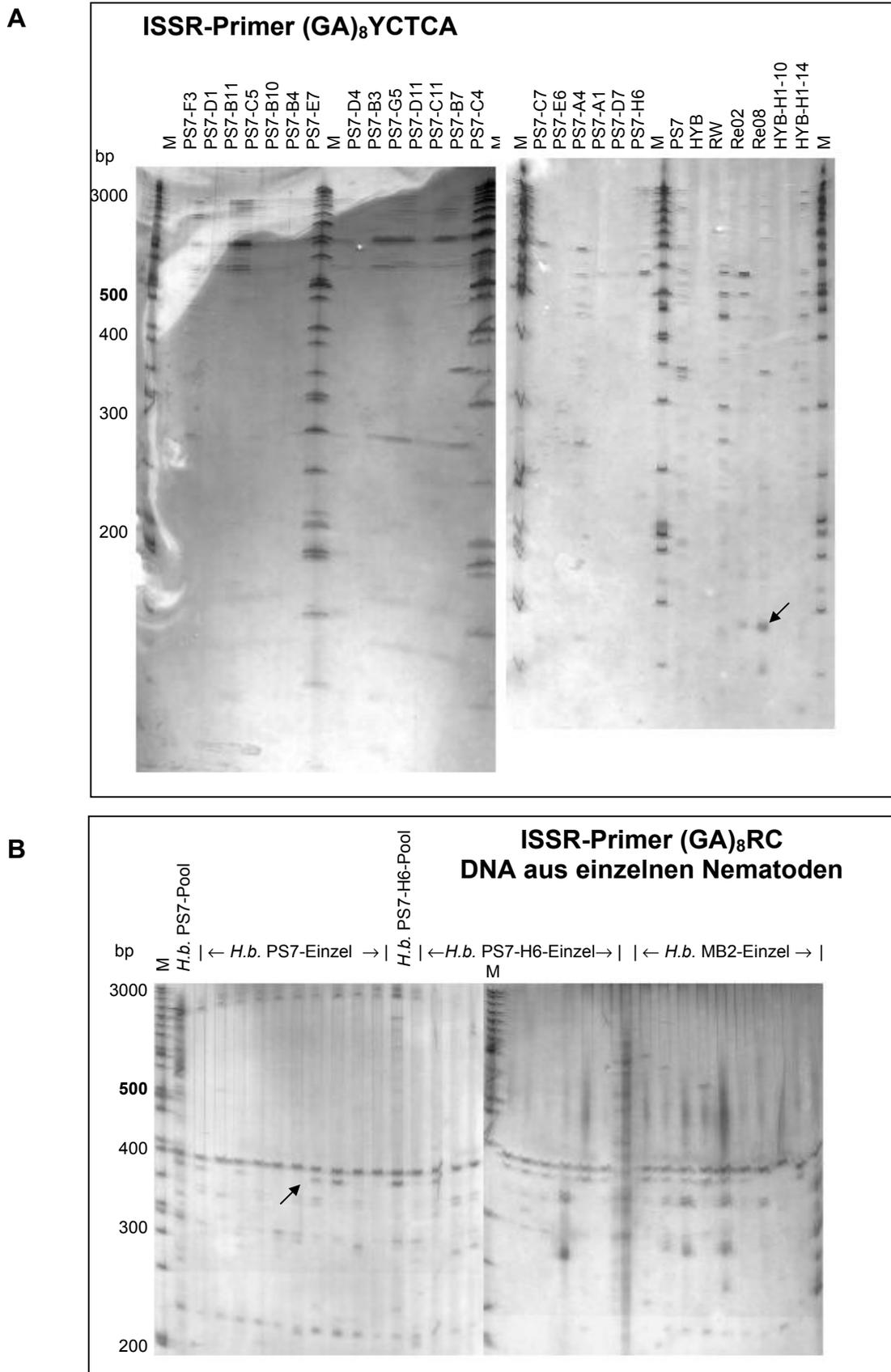


Abb. 8.25. ISSR-PCR-Profil von 20 Inzuchtlinien und dem Ausgangsstamm *H. bacteriophora* PS7 sowie des kommerziellen *H. bacteriophora*-Hybrids HYB, dessen Re-Isolaten (RW, Re02, Re08) und Selektionslinie (HYB-H1-10 bzw. HYB-H1-14). Die Pfeile (►) verweisen auf einige polymorphe Banden. M = Marker. **A.** Primer (GA)₈YCTCA. **B.** Vergleich der PCR-Profile mit dem Primer (GA)₈RC mit gepoolter DNA („-Pool“) oder mit DNA aus Einzelnematoden (jeweils 10 Individuen; „-Einzel“) als Template (vgl. mit Abb. 8.19 B).

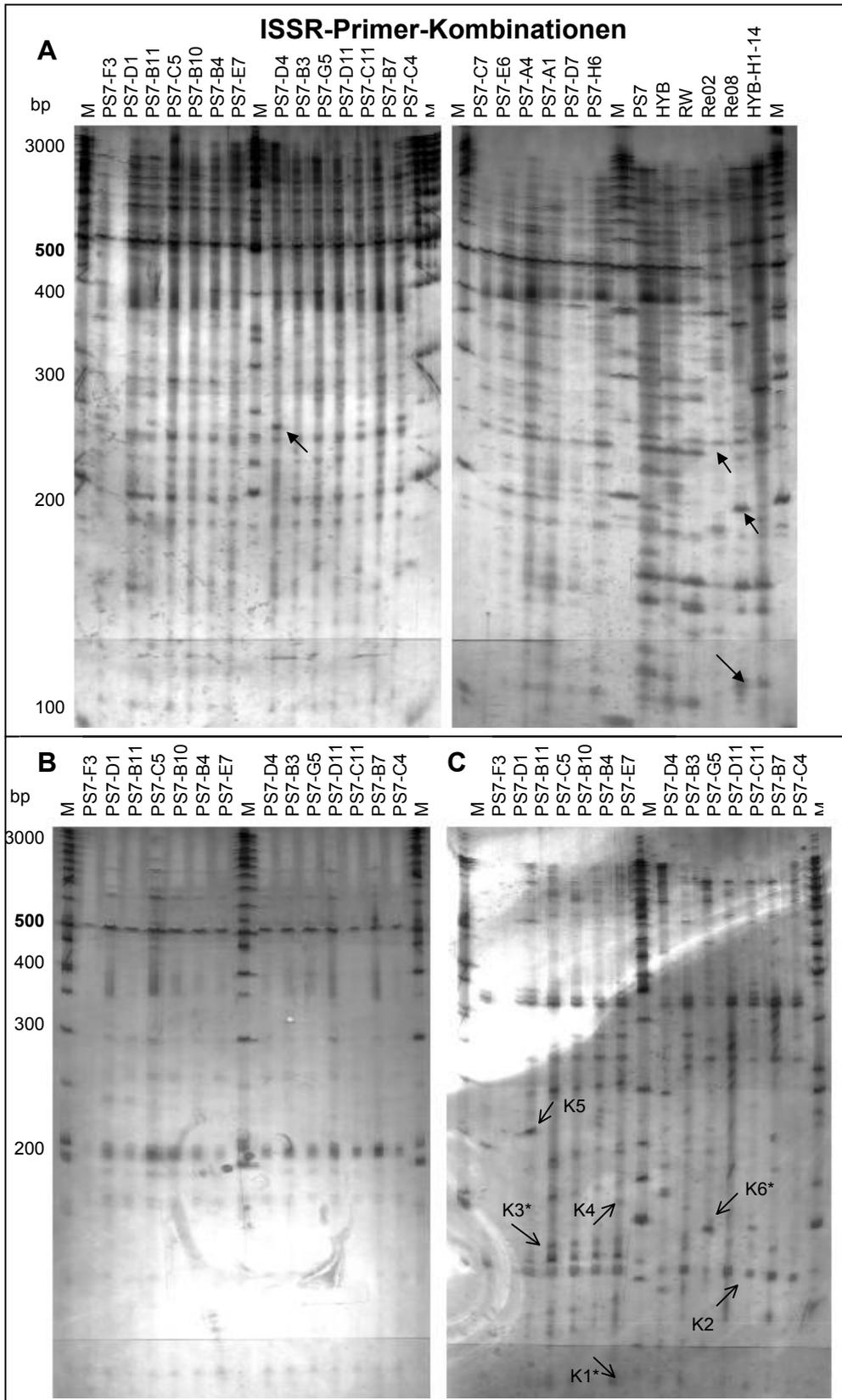


Abb. 8.26. ISSR-PCR-Profil von 14 bzw. 20 Inzuchtlinien und dem Ausgangsstamm *H. bacteriophora* PS7 sowie des kommerziellen *H. bacteriophora*-Hybrids HYB, dessen Re-Isolaten (RW, Re02, Re08) und Selektionslinien (HYB-H1-14). Bei den mit offenen Pfeilen (>) gekennzeichneten Banden wurde eine direkte Sequenzierung versucht. K = Banden, die nur bei der Kombination der beiden Primer nachweisbar waren, * = Sequenzierung des DNA-Fragments gelungen. Die anderen Pfeile (▶) verweisen auf einige polymorphe Banden. M = Marker. **A.** Kombination der Primer (GACAC)₃YC und CY(GA)₈. **B.** Kombination der Primer TK(GACA)₄ und CY(GA)₈. **C.** Kombination der Primer (GACAC)₃YC und (ACTG)₄YG.

Tab. 8.8. Genetische Distanzen berechnet nach Nei & Li (1979) für die Inzuchtlinien des Hybridstammes *H. bacteriophora* PS7 bei der ISSR-PCR-Analyse.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1 <i>H.b.</i> PS7-F3	-																				
2 <i>H.b.</i> PS7-D1	14	-																			
3 <i>H.b.</i> PS7-B11	8	13	-																		
4 <i>H.b.</i> PS7-C5	23	19	15	-																	
5 <i>H.b.</i> PS7-B10	20	15	13	10	-																
6 <i>H.b.</i> PS7-B4	10	13	6	14	13	-															
7 <i>H.b.</i> PS7-E7	10	17	10	15	18	6	-														
8 <i>H.b.</i> PS7-D4	25	16	17	15	12	15	17	-													
9 <i>H.b.</i> PS7-B3	10	13	12	15	13	8	12	15	-												
10 <i>H.b.</i> PS7-G5	23	16	16	20	18	16	20	15	18	-											
11 <i>H.b.</i> PS7-D11	16	14	12	11	10	12	15	11	12	17	-										
12 <i>H.b.</i> PS7-C11	21	16	16	17	10	14	16	15	18	19	11	-									
13 <i>H.b.</i> PS7-B7	18	13	12	7	7	12	16	12	10	19	8	14	-								
14 <i>H.b.</i> PS7-C4	18	21	12	15	11	12	16	17	18	20	13	14	14	-							
15 <i>H.b.</i> PS7-C7	19	17	16	12	15	12	10	12	14	21	12	16	13	16	-						
16 <i>H.b.</i> PS7-E6	19	23	25	23	22	18	18	25	14	28	21	22	22	25	18	-					
17 <i>H.b.</i> PS7-A4	24	20	17	10	12	16	16	13	17	20	15	15	10	14	10	21	-				
18 <i>H.b.</i> PS7-A1	24	28	23	23	21	23	25	28	23	35	24	22	22	23	24	18	23	-			
19 <i>H.b.</i> PS7-D7	26	25	27	36	29	27	32	30	27	33	30	32	31	32	36	28	39	20	-		
20 <i>H.b.</i> PS7-H6	23	22	20	11	14	16	20	20	14	23	13	17	16	20	16	18	15	24	31	-	
21 <i>H.b.</i> PS7	33	19	28	16	22	28	30	25	24	29	25	29	22	28	24	36	25	37	40	22	-

Field trials with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* against white grubs of the European cockchafer (*Melolontha melolontha*) in the southern part of Germany

Martin Berner, Wolfgang Schnetter

Institute of Zoology, University of Heidelberg, INF 230, D-69120 Heidelberg, Germany

Abstract: The entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* is successfully used to control white grubs of the garden chafer (*Phyllopertha horticola*) in meadows and golf courses. To test the efficiency of this nematode against white grubs of the European cockchafer (*Melolontha melolontha*) in the field we performed two trials in orchards and one in an vine yard in the southern part of Germany. In one orchard *Beauveria brongniartii* had been additionally applied. Only under optimal conditions and with high doses of nematodes 33 % (1 million nematodes per m² and *B. brongniartii*) and 35 % (2.5 million nematodes per m²) control of grubs could be reached.

We report about the results and discuss the methods and difficulties of this trials. For the application of nematodes we propose a new variant.

Key words: *Heterorhabditis bacteriophora*, *Beauveria brongniartii*, *Melolontha*, white grubs, biological control

Introduction

The entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* is successfully used to control white grubs of the garden chafer *Phyllopertha horticola* on meadows and golf courses (Sulistyanto and Ehlers, 1996) or in special cultures like potted yew against grubs of the Japanese beetle *Popillia japonica* (Wright et al., 1988). To test the efficiency of this nematode against white grubs of the European cockchafer (*Melolontha melolontha*) in the field we performed two trials in orchards and one in an vine yard in the southern part of Germany. In one orchard the entomophagous fungus *Beauveria brongniartii* had been applied additionally before and during the trial.

Materials and Methods

Nematodes

The nematode *Heterorhabditis bacteriophora* were obtained from E-Nema GmbH, Raisdorf, Germany. The nematodes were mass reared in liquid culture and sold normally under the product name 'nema-green[®]'. The following concentrations of nematodes were tested: **c0** = 0 (control plain, only water), **c1** = 0.5 million DL/m², **c2** = 1.0 million DL/m², **c3** = 2.0 million DL/m², **c4** = 2.5 million DL/m² (DL/m² = Dauer Larvae of the nematode per square meter).

Fungi

Beauveria brongniartii were obtained from Samen-Schweizer AG, Thun, Switzerland. The application were conducted with an modified sowing machine laying the granules in three rows (30 cm distance) and 10 cm depth into the soil.

A new variant of application for nematodes

In the Kaiserstuhl field trial we tested a new variant of application for nematodes. A standard pesticide sprayer for vine yards had been modified. Two grooves of approximately 8 cm depth were dug into the soil and the nematode suspension was poured directly into these grooves. The grooves were covered again through the tyres of the pesticide sprayer. The space between the two grooves was 1 m and the distance of two rows of vine was 1.70 m. In the two apple orchards the nematode suspension had been poured on the soil surface with a watering can.

Characterisation of the field trials

	Orchard in Nieder-Beerbach, near to Darmstadt	Orchard in Dielheim-Horrenberg, near to Heidelberg	Vine yard in the area of the Kaiserstuhl
date of application	4.9.98	14.8.99	19.7.01
date of control	26.5.99	19.5.00	12.9.01
Plots	5 x 4 = 20 m ²	5 x 3.5 = 17.5 m ²	1800 m ²
c0	8 plots	32 plots	1 plot
c1	8 plots	32 plots	-
c2	6 plots	30 plots	-
c3	-	29 plots	-
c4	-	-	1 plot
soil	clay soil	clay soil	clay soil
kind of application	watering can on the soil surface	watering can on the soil surface	modified pesticide sprayer into the soil (8 cm deep)
volume	0.8 l/m ²	0.5 l/m ²	0.2 l/m ²
<i>Beauveria brongniartii</i>	had been applied before and during the trial	had been applied before the trial	no prior application
date of application	20.4.99 (3 g/m ²)	-	-
weather	rain before, during, and after application	rain before and during application, afterward very hot and dry	rain before application, afterward very hot and dry

Evaluation of nematode efficiency

The grub density of the treatments and the control plots were determined by counting the number of grubs from 9 or 10 soil samples of 20 x 20 cm (Nieder-Beerbach, Dielheim-Horrenberg) or 50 x 100 cm (Kaiserstuhl) and 30 cm depth from each plot. In Dielheim-Horrenberg only 10 plots from each treatment were evaluated. The mean number of larvae in treated and untreated plots at each sampling date were compared with Tukey's test (Biosoft Stat100, Version 1.28). The reduction rate was calculated according to Abbott (1925).

Occurrence of infections in the grub populations

While the sampling dates we registered all founded dead or infected larvae and determined the responsible pathogen so far as possible.

Results and discussion

Table 1. Overall occurrence of pathogens in white grubs of the European cockchafer while the control dates.

pathogen / area	Nieder-Beerbach	Dielheim-Horrenberg	Kaiserstuhl
<i>Beauveria brongniartii</i>	4.0 %	9.9 %	2.0 %
<i>Metarhizium anisopliae</i>	0	0	0.1 %
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	0	0	0.2 %
not defined	1.6 %	3.7 %	0.5 %

Table 2. Abbott corrected reduction rates of grubs. No significance could be recorded using Tukey's test ($p < 0.05$).

concentration / area	Nieder-Beerbach	Dielheim-Horrenberg	Kaiserstuhl
c1	9.5 %	0	-
c2	33.1 %	0	-
c3	-	13.3 %	-
c4	-	-	35 %

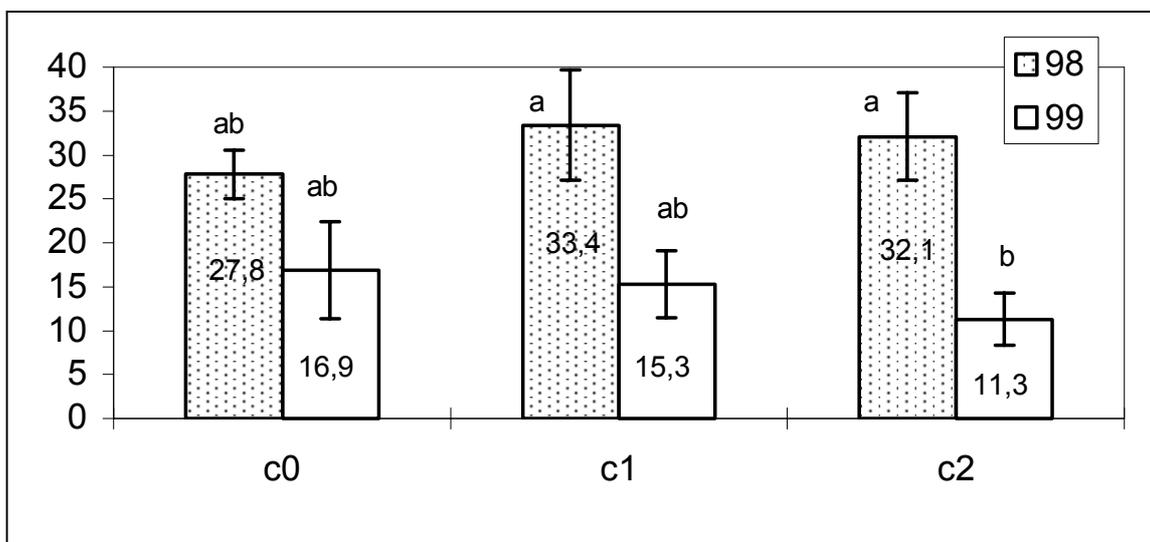


Figure 1. Field trial in Nieder-Beerbach, near to Darmstadt. Average numbers of grubs per square meter for each nematode concentration (c0, c1, c2). The left columns (grey) show the numbers before the treatment with nematodes and the right columns (white) show the numbers of the first control. Means followed by the same letter are not significantly different (Tukey's test, $p < 0.05$).

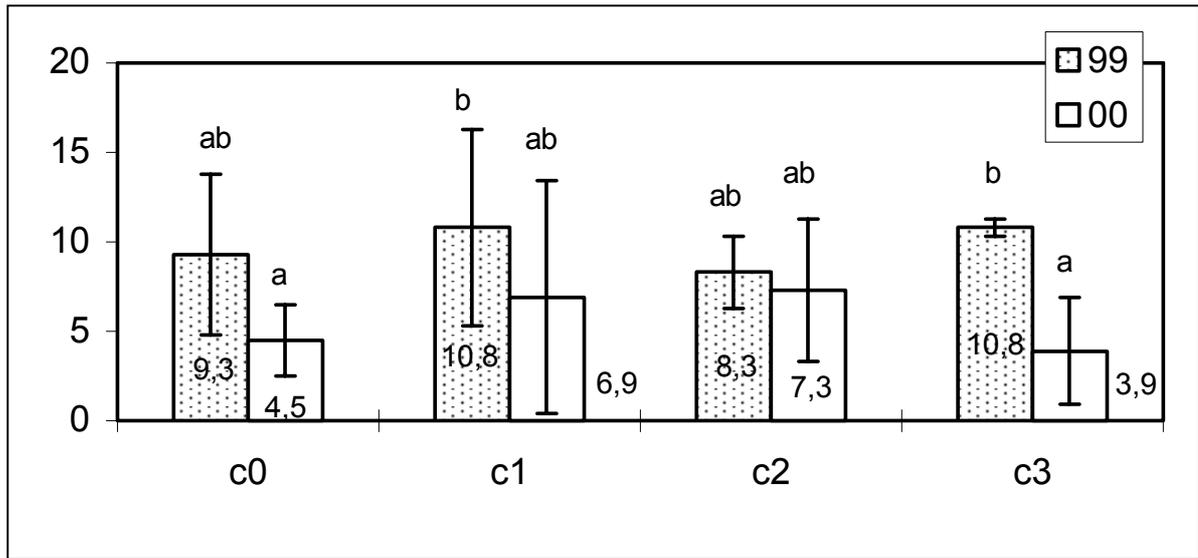


Figure 2. Field trial in Dielheim-Horrenberg, near to Heidelberg. Average numbers of grubs per square meter for each nematode concentration (c0, c1, c2, c3). The left columns (grey) show the numbers before the treatment with nematodes and the right columns (white) show the numbers of the first control. Means followed by the same letter are not significantly different (Tukey's test, $p < 0.05$).

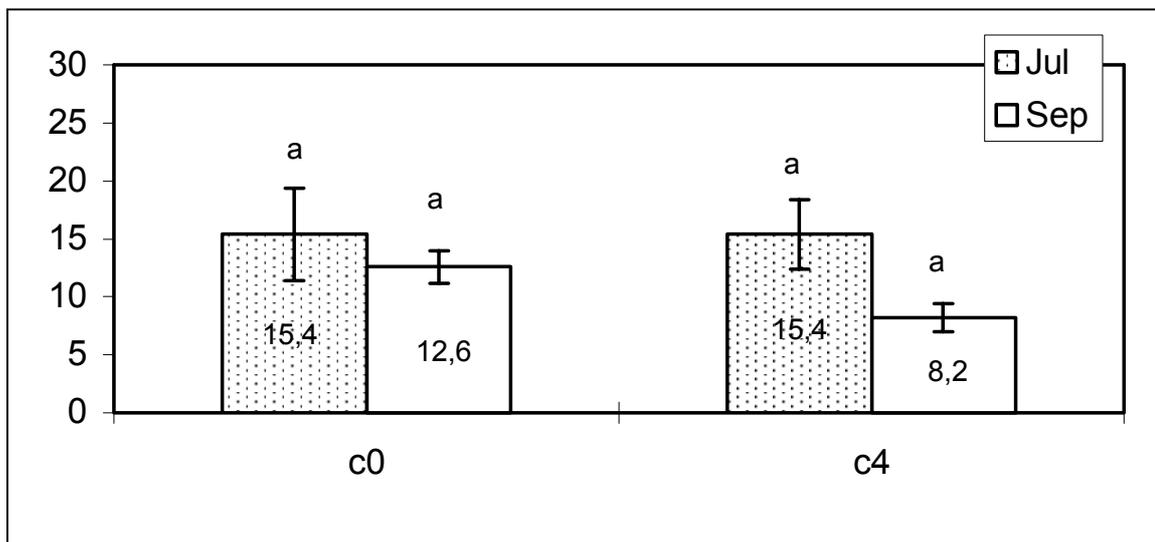


Figure 3. Field trial in the Kaiserstuhl area. Average numbers of grubs per square meter for each nematode concentration (c0, c4). The left columns (grey) show the numbers before the treatment with nematodes and the right columns (white) show the numbers of the first control. Means followed by the same letter are not significantly different (Tukey's test, $p < 0.05$).

These results showed that only with optimal weather and application conditions, a high grub density, a high dose of nematodes (1 million DL/m² or more) and an additional application of *Beauveria brongniartii* a grub reduction of up to 33 % (Nieder-Beerbach, figure 1 and table 2) could be reached. The additional application of the entomophagous fungus *B. brongniartii*

seems to have a synergistic effect on the efficiency of the nematodes. In all three areas we could record a relatively high infestation with this fungus, even in the Kaiserstuhl trial where no prior application of this fungus had been performed (table 1). The reason for this high rate in the Kaiserstuhl might be that some vine yards in the neighbourhood of the trial yard had been treated with *Beauveria*. The application of *Beauveria* in the two apple orchards during the last few years explains the relatively high infestation by this fungus in these areas (table 1). The overall reduction of the grub density in all plots of the two orchards at the control date has to be explained by the long time period between nematode treatment and the control.

A general problem while performing field trials to control white grubs of the cockchafer is the extremely inhomogeneous distribution of the grubs in the soil, particularly if the density is not very high. This case we had especially in Dielheim-Horrenberg, where we found a relatively low density of grubs and a high fluctuation of the number of grubs between and within plots (figure 3). In this trial as well as in the Kaiserstuhl trial the weather conditions after the application were very detrimental for nematodes (very hot and dry for some weeks). Therefore only 13% reduction with 2 million DL/m² and no effect with the lower doses could be recorded in Dielheim-Horrenberg. In the Kaiserstuhl trial we found a high density and a relatively homogenous distribution of grubs about a large area (figure 3). Despite bad weather conditions the reduction reached 35 % (2.5 million DL/m²). This relatively good result might be due to the new application variant and the high dose of nematodes. The new variant combines several advantages like an effective protection of the nematodes against UV radiation and desiccation and no loss of nematodes on the leaves of the grass leading to a possible reduction of the total quantity of nematodes. In none of the three trials we ever found a nematode infected grub. Therefore it was very surprisingly and interestingly for us to find two nematode-infected, red-brown coloured grubs in the Kaiserstuhl area (one we found before nematode application and one after application on the control plot far away from the nematode-treated plot and close to the position where the first had been found). In the lab we were able to isolate these nematodes and to propagate them in *Galleria* larvae. We proved via RAPD-PCR clearly that this isolate is a new *H. bacteriophora*-isolate (Berner, 2001, not published). This was the fourth proof of *H. bacteriophora* from Germany and the first proof of this nematode species from grubs of *M. melolontha* under natural conditions. Natural infections with *H. bacteriophora* in grub populations are pretty rare. Glare et al. (1993) could prove *H. bacteriophora* infections in grubs of the June beetle *Amphimallon solstitialis* near to Darmstadt in the southern part of Germany. Considering that the carcasses of nematode-infected insects in the soil are dissolved quite fast (in comparison with *Beauveria* infected ones) we assume that the rate of infection with this nematode is much higher than we could recognise it (table 1). Investigations about the putative control potential for grubs of this new isolate are currently in work.

Compared to the results of other authors reaching up to 83 % control against the garden chafer *Phyllopertha horticola* (Sulistyanto and Ehlers, 1996) and more than 60 % against the Japanese beetle *Popillia japonica* (Villani & Wright, 1988), respectively, our results are not satisfying. Further studies should be done to find new isolates and to increase the infectivity of the commercially produced nematodes. Berner & Schnetter (2001a) started a selection program to increase the infectivity for *H. bacteriophora* and *Steinernema glaseri* against grubs of the European cockchafer via host passages which was successful only with the latter species. *S. glaseri* and closely related nematode species are known to be the most effective species against many scarab larvae but most of them are not indigenous and their use in Europe will be restricted (Peters, 2000; Berner & Schnetter, 2001b). Some new European nematode isolates probably belonging to the '*S. glaseri*-group' has been found recently and should be tested.

Currently the commercially produced entomopathogenic nematode *H. bacteriophora* can only be recommended as an additional factor in combination with the entomophagous fungus *B.*

brongniartii to control white grubs of the European cockchafer. Further studies to improve the application techniques (e.g. combined application of *Beauveria* and nematodes with one machine at the same time) should be done.

Acknowledgements

We thank the growers Willi G. Muth, Manfred Epp and Volker Buchmüller for their support in practising the nematode application. Special thanks to E-Nema for supplying their nematode product.

References

- Abbott, W.S. 1925: A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Economic Entomology* 18: 265-267.
- Berner, M. & Schnetter, W. 2001: Wirksamkeit entomopathogener Nematoden gegen Engerlinge der Maikäfer (*Melolontha melolontha* und *M. hippocastani*). Mitt. DgaaE, Band 14, Düsseldorf 2001: in press.
- Berner, M. & Schnetter, W. 2001: Nematoden zur Bekämpfung von Maikäfer-Engerlingen. *Laimburg Journal* 1 (2): in press.
- Glare, T.R., Jackson, T.A. & Zimmermann, G. 1993: Occurrence of *Bacillus popilliae* and two nematode pathogens in populations of *Amphimallon solstitialis* (Col.: Scarabaeidae) near Darmstadt, Germany. *Entomophaga* 38 (4): 441-450.
- Peters, A. 2000: Susceptibility of *Melolontha melolontha* to *Heterorhabditis bacteriophora*, *H. megidis* and *Steinernema glaseri*. *IOBC wprs Bulletin* 23 (8): 39-45.
- Smits, P.H. 1992: Control of white grubs, *Phyllopertha horticola* and *Amphimallon solstitialis* in grass with Heterorhabditid nematodes. In „Use of pathogens in scarab pest management“ (GLARE, T. R., and JACKSON, T. A., eds.), Intercept, Andover, ch. 19: 229-235.
- Sulistyanto, D. & Ehlers, R.-U. 1996: Efficacy of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis megidis* and *Heterorhabditis bacteriophora* for the control of grubs (*Phyllopertha horticola* and *Aphodius contaminatus*) in golf course turf. *Biocontrol Science and Technology* 6: 247-250.
- Villani, M.G. & Wright, R.J. 1988: Entomogenous nematodes as biological control agents of European chafer and Japanese beetle (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae infesting turfgrass. *J. Economic Entomology* 81 (2): 484-487.
- Wright, R.J., Villani, M.G. & Agudelo-Silva, F. 1988: Steinernematid and Heterorhabditid nematodes for control of larval European chafers and Japanese beetles (Coleoptera: Scarabaeidae) in potted yew. *J. Economic Entomology* 81 (1): 152-157.