

Untersuchungen der genetischen Diversität von Maiszünsler-Populationen (*Ostrinia nubilalis*, Hbn.) und ihrer Suszeptibilität gegenüber dem *Bacillus thuringiensis* (Bt)–Toxin als Grundlage für ein Resistenzmanagement in Bt-Maiskulturen

Der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen vorgelegte Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften

von

Diplom-Biologin

Christiane Saeglitz

aus Wuppertal

Berichter:

Priv.-Doz. Dr. rer.nat. Detlef Bartsch, RKI, Berlin
Universitätsprofessor Dr. rer.nat. Ingolf Schuphan

Tag der mündlichen Prüfung: 3.5.2004

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

Inhalt

1. Einleitung	1
2. Allgemeiner Teil	7
2.1 Mais	7
2.2. Der Maiszünsler (<i>Ostrinia nubilalis</i> HÜBNER)	8
2.2.1 Verbreitung	8
2.2.2 Lebenszyklus und Entwicklung	9
2.2.3 Schaden	11
2.2.4 Bekämpfung	12
2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i>	13
2.3.1 Allgemeines	13
2.3.2 Systematik	13
2.3.3 Wirkungsmechanismus	14
2.3.4 Struktur und Funktion	15
2.3.5 Anwendungsbereiche und Produktion	15
2.3.6 Bt-Gene in Kulturpflanzen	16
2.3.7 Resistenzproblematik	17
3. Material und Methoden	20
3.1 Maiszünslersammlung	20
3.2 Laborzucht	24
3.3 Untersuchung auf Mikrosporidien	26
3.4 Genetische Diversitätsbestimmungen	29
3.4.1 Prinzip der PCR	29
3.4.2 Elektrophoretische Auftrennung	30
3.4.3 Auftrennung mit Hilfe von Agarosegelen	31
3.4.4 DNA-Isolation	33
3.4.5 AFLP	35
3.4.6 RAPD-PCR	49
3.4.7 Auswertung der DNA-Fingerprint-Techniken	53
3.5 Toxizitätstest	57
3.5.1 Bt Toxine	58
3.5.2 Untermischmethode	59
3.5.3 Oberflächenapplikation	60
3.5.4 Testauswertung	61

3.6 Selektion auf toxinhaltigem Futter	62
3.7 Sammeln von Maiszünslern in transgenen Maisparzellen	62
3.8 DNA-Nachweismethode für gentechnisch veränderten Mais	63
4. Ergebnisse	65
4.1 Genetische Charakterisierung unterschiedlicher Maiszünslerpopulationen	65
4.1.1 AFLP-Methode.....	65
4.1.1.1 Optimierung der Restriktion	65
4.1.1.2 Verwendete Primerkombinationen	66
4.1.1.3 Polymorphiegrad und Shannon-Index.....	68
4.1.1.4 Genetische Distanz und genetische Ähnlichkeit	70
4.1.2 Genetische Charakterisierung mit Hilfe der RAPD-Methode	76
4.1.2.1 Polymorphiegrad und Shannon-Index.....	76
4.1.2.2 Genetische Ähnlichkeit und genetische Distanz	78
4.2 Toxizitätstest	85
4.2.1 Untermischmethode.....	85
4.2.2 Oberflächenapplikation	88
4.3 Selektion auf toxinhaltigem Futter	89
4.4 DNA-Nachweis von gentechnisch verändertem Mais.....	91
4.5 Untersuchung auf Mikrosporidien	92
5. Diskussion	94
5.1 Populationsgenetische Differenzierung des Maiszünslers	94
5.2 Toxizitätstest zur Ermittlung der Basissuszeptibilität	101
5.3 Selektion auf toxinhaltigem Futter	103
5.4 Sammeln von Maiszünslern in transgenem Mais.....	106
5.5 Optimierung der Zuchtbedingungen – Mikrosporidiennachweis	107
5.6 Ausblick für den Aufbau eines Resistenz-Monitoringsystems für den Maiszünsler in Deutschland und Europa	108
6. Zusammenfassung	111
6.1 Abstract.....	114

7. Verzeichnisse	115
7.1 Literaturverzeichnis	115
7.2 Abbildungsverzeichnis	128
7.3 Tabellenverzeichnis	130
8. Anhang	134
8.1 Basisdaten zur Analyse verwandtschaftlicher Beziehungen	134
8.1.1 AFLP 0/1-Matrix	134
8.1.2. RAPD 0/1-Matrix	143
8.2 Basisdaten Toxizitätstests	146
8.2.1 Untermischmethode (UG).....	146
8.2.2 Oberflächenapplikation (OA)	153
8.3 Selektion mit toxinhaltigem (Cry1Ab) Futter	155

1. Einleitung

Gentechnisch veränderter Mais, der das *Bacillus thuringiensis* (Bt) Toxin exprimiert, soll gegen Fraßschäden durch den Hauptschädling im Maisanbau, den Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis* Hübner) schützen. Da dieser Bt-Mais ein modifiziertes bakterielles Gen für das lepidopteren-spezifische Toxin Cry1Ab besitzt, sterben die Larven des Maiszünslers beim Fraß an diesen Pflanzen. In den letzten Jahren wurden verschiedene Bt-Events von Saatgutherstellern entwickelt. Als Event bezeichnet man ein positives Transformationsereignis, dass bei einer Pflanzenart das spezifische Genkonstrukt an einem (meist unbekanntem) spezifischem Integrationsort beschreibt. Beim 1995 erstmals zugelassenen Event Bt 176 (Firma Novartis) wurde ein synthetisches Gen für eine verkürzte Form des Cry1Ab Endotoxins in Maisembryos eingebracht. Die Linie MON 810 (Firma Monsanto, USA) enthält ebenfalls ein modifiziertes Cry1Ab-Gen. Einige Mais-Transformationsereignisse besitzen seit 1997 eine gentechnikrechtliche Genehmigung zum freien Anbau (Inverkehrbringungs Zulassung) innerhalb der EU. Da in Deutschland und den meisten anderen EU Staaten eine sortenrechtliche Zulassung bisher nicht erfolgt ist, wird dieser Bt-Mais nur in Spanien kommerziell angebaut (Saeglitz & Bartsch 2003).

Eine nachhaltige Nutzung von Bt-Toxin exprimierenden Pflanzen ist nur möglich, wenn Insektenresistenzen langfristig vermieden werden (Schuphan et al. 2002). Da bei transgenem, insektenresistentem Mais eine Expression des lepidopteren-schädigenden Toxins über die gesamte Vegetationszeit des Mais erfolgt, ist die Exposition im Vergleich zu herkömmlichen Bt-Spritzpräparaten erhöht. Daraus könnte ein stärkerer Selektionsdruck zur Auslese von resistenten Maiszünslern resultieren, der bei großflächigem Anbau von Bt-Mais ein Resistenzmanagement erforderlich machen könnte. Solch ein Resistenzmanagement wird eine zentrale Bedeutung bei der nachhaltigen Nutzung von Pflanzen mit gentechnisch erzeugter Insektenresistenz haben. Die Entstehung von Resistenzen beim entsprechenden Schadorganismus ist ein wichtiger Aspekt bei der Nutzung dieser neuen Technologie und sollte möglichst lange hinausgezögert werden (Morin et al. 2003). Eine frühe Bildung solcher Resistenzen könnte in kürzester Zeit den Nutzen transgener Kulturpflanzen in Frage stellen (Carriere et al. 2003). Durch den schnellen und in einigen Ländern extensiven Einsatz insektenresistenter Pflanzen hat sich das Risiko einer Anpassung der adressierten Schädlinge an die entsprechende Toxine erhöht (Gould 1998) und dazu geführt, dass weltweit an Konzepten eines Resistenzmanagements gearbeitet wird (Bourguet et al. 2003). Nur durch ein Verständnis der genetischen Basis und der unterschiedlichen Wirkungsmechanismen solcher Resistenzen kann ein sinnvolles Resistenzmanagement entwickelt werden (Hawthorne 2001). Wichtig ist dabei die Kenntnis des genetischen

Hintergrundes der betreffenden Insektenpopulationen, sowie ihre Reaktion und Empfindlichkeit gegenüber dem Toxin der Kulturpflanze. Weiterhin sollten Daten zum Verhalten der adressierten Schadinsekten vorhanden sein, z. B. über das Wanderungs- und Ausbreitungsverhalten, über alternative Futterpflanzen, über den Genfluss innerhalb einer Population, sowie zwischen den verschiedenen Populationen und Rassen.

In der hier vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss des Bt-Toxins auf den Maiszünsler im Hinblick auf eine mögliche Resistenzentwicklung untersucht werden. Die Arbeit soll in zwei unterschiedlichen Bereichen Kenntnislücken schließen: Im ersten Bereich sollen präventive Maßnahmen (Teil A) erarbeitet werden. Dabei soll zum einen eine Charakterisierung des Genflusses erfolgen, um Rückschlüsse auf die mögliche Verbreitungsgeschwindigkeit einmal selektierter Resistenzgene zu erreichen. Zum zweiten sollen mögliche geographisch isolierte Maiszünsler identifiziert werden. Dazu sollte eine Erfassung der in Deutschland vorhandenen Maiszünslerpopulationen erfolgen, sowie die molekulare Charakterisierung nach geographischen Herkunft, um eine Abgrenzung einzelner Populationen zu ermöglichen. Weiterhin sollten Aussagen über den genetischen Austausch innerhalb und zwischen den Populationen, sowie zwischen den beiden vorkommenden Rassen gemacht werden. Dafür sollte in dieser Arbeit eine Methode entwickelt werden, um die genetische Struktur verschiedener Maiszünslerpopulationen zu erfassen und zu untersuchen, um dadurch Rückschlüsse auf den Genfluss zu erhalten. Die molekulare Fingerprintmethode der AFLP-Analyse soll an diesem Lehrstuhl etabliert und für Insekten-DNA optimiert werden. Weiterhin sollte die Eignung dieser Methode für die hier erwähnten Fragestellung überprüft und mit herkömmlichen Methoden der RAPD-Analyse verglichen werden.

Im zweiten Bereich sollte ein begleitender und beobachtender Ansatz erarbeitet werden (Teil B). Dabei steht die Entwicklung geeigneter Methoden für eine effiziente, spezifische Umweltbeobachtung (flächendeckend und kostengünstig) im Vordergrund, die die Funktion eines Frühwarndienstes inne hat. Um ein Konzept zum deutschlandweiten Resistenzmonitoring zu erstellen, sollten erst einmal die Grundlagen in der Reaktion des Maiszünslers auf das Bt-Toxin bekannt sein. Dafür sollte die Basissuszeptibilität dieser verschiedenen Maiszünslerstandorte gegenüber dem Bt-Toxin ermittelt werden, um in langfristigen folgenden Untersuchungen, insbesondere nach der großflächigen Einführung von Bt-Mais, eine mögliche Ausbildung von Resistenz frühzeitig erkennen zu können, z. B. durch Abweichungen von der Basissuszeptibilität. Zur Ermittlung dieser Grunddaten sollte in Biotests die Empfindlichkeit der Larven ausgewählter Regionen aus bedeutenden Maisanbaugebieten Deutschlands bestimmt werden (Saeglitz et al. 2000). Ein wesentlicher Punkt ist dabei die Erfassung der geographischen Variabilität der verschiedenen

Populationen und Rassen in Deutschland, da diese sich genetisch stark unterscheiden können und demnach auch unterschiedliche Resistenzniveaus ausbilden könnten. Wie viele verschiedene Populationen später im Rahmen eines deutschlandweiten Resistenzmanagements auf Änderungen in ihrer Basissuszeptibilität überprüft werden sollen, soll an Hand der hier zu ermittelnden Daten entschieden werden können.

Diese Untersuchungen sind von grundlegender wissenschaftlicher und praktischer Bedeutung für alle späteren Aussagen über eine möglicherweise sich entwickelnde Resistenz des Maiszünslers gegenüber Bt-Toxinen nach großflächigem Anbau von transgenem Bt-Mais. Durch die zu erarbeitenden Daten zur genetischen Struktur und Variabilität der Maiszünslers in Deutschland, sollten Prognosen über eine mögliche Verbreitung von Resistenzen erleichtert werden.

Die Untersuchungen dieser Arbeit sind Teil eines durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Projektes (Monitoring der Anpassung des Maiszünslers an transgenen *Bacillus thuringiensis* Mais).

Im Einzelnen sollten folgende Fragestellungen in dieser Arbeit behandelt werden:

Teil A. molekulargenetische Untersuchungen:

- 1. Ist die AFLP-Methode eine geeignete Technik, um den genetischen Hintergrund und die Variabilität der Maiszünslers zu untersuchen, sowie Maiszünslerp Populationen genetisch voneinander abgrenzen zu können?*
- 2. Können mit der AFLP-Methode genetische Unterschiede zwischen Maiszünslern verschiedener Wirtspflanzen (Mais und Beifuss) erkannt werden und diese voneinander abgegrenzt werden?*
- 3. Sind genetische Variabilitäten zwischen weiblichen und männlichen Tieren mit Hilfe molekularer Fingerprint-Methoden zu erkennen?*
- 4. Können die ermittelten Ergebnisse der beiden verwendeten Methoden (AFLP und RAPD-PCR) miteinander verglichen werden und welche der beiden Methoden eignet sich besser für die hier erwähnten Fragestellungen?*

Teil B. Basissuszeptibilität:

1. *Welcher Biotest kann für die Basissuszeptibilität der Maiszünslerlarven verwendet werden?*
2. *Sind geographische Unterschiede in der Basissuszeptibilität bei Maiszünslern zu erkennen?*
3. *Wie wirkt sich der Einsatz unterschiedlich hergestellter Arten der Cry1Ab Bt-Toxine (Protoxin/ verkürztes Toxin) auf die Basissuszeptibilität aus?*
4. *Kann durch eine Fütterung von toxinhaltigem Medium ein resistenter Maiszünslerlaborstamm selektioniert werden?*

2. Allgemeiner Teil

2.1 Mais

Der Mais (*Zea mays* ssp. *mays* L.) wird in die Familie der Süßgräser eingeordnet (Poales: Poaceae; Systematik nach Heywood 1993) und ist ein einjähriges Gras, dessen markhaltiger Stängel bis zu 2,50 m hoch und bis zu 5 cm dick wird. Die Halme sind massiv und enden als Rispe in der männlichen Infloreszenz. Die weiblichen Blütenstände entspringen in Ein- bis Dreizahl den Blattachseln als Seitentriebe. Sie stellen kurz gestielte Kolben dar, die von einigen Hüllblättern, den Lieschen, umgeben sind. In Abb. 2.1 sind Entwicklungsstadien der Maispflanze dargestellt. Die Blütezeit in Deutschland ist Juli–Oktober. Da die männlichen Blüten vor den weiblichen der gleichen Pflanze reifen, ist Fremdbestäubung durch Wind die Regel (Franke 1997). Mais gehört zu den wichtigsten Anbaufrüchten der Welt. Der Sortenreichtum ist durch jahrtausendelange Kultivierung groß. Vor ungefähr 6300 Jahren



wurde Mais in Mexiko aus dem Wildgras Teosinte domestiziert (Jaenicke-Despres 2003) und 1493 von Columbus in Europa eingeführt (Rebourg et al. 2003). Die früheren Landsorten sind inzwischen durch Hochzuchten abgelöst worden. Durch Inzucht-Heterosiszüchtung werden die sogenannte Hybridmaissorten gewonnen, die deutlich höhere Erträge bringen. Dabei nutzt man den Heterosiseffekt, der bei der Kombination reinerbiger Inzuchtlinien zu gesteigerten Erträgen bei den Nachkommen führt.

Abb. 2.1 Verschiedene Entwicklungsstadien des Mais

Obwohl Mais eine Pflanze der Tropen und Subtropen ist, können einige Sorten auch in gemäßigten Breiten angebaut werden. Allerdings verträgt der Mais keinen Frost. Der Maisanbau in den einzelnen EU-Ländern unterscheidet sich je nach Nutzungsrichtung. 2002 wurde in der gesamten EU zu etwa 55 % Körnermais angebaut. (Janinhoff 2003). In den Ländern der gemäßigten Zone wird Mais hauptsächlich als Viehfutter verwendet, das in Körnerform (Körnermais), als Grünfutter oder Silage (Futtermais oder Silomais) oder als „Corn-Cob-Mix“ (CCM) verfüttert wird. In Deutschland wird auf 14% der landwirtschaftlich genutzten Fläche 1,5 Millionen Hektar Mais angebaut. Dabei liegt der Anteil des Silomais bei 80% des Gesamtmaisbaus (Meßner 2002). Wichtige Anbauggebiete liegen in den USA, China, Argentinien und Brasilien. In klimatisch wärmeren Gebieten, wie etwa auch in

Mitteleuropa wird außerdem Zuckermais angebaut, der als Nahrungsquelle für den Mensch genutzt wird (Christiansen & Hancke 1993).

2.2. Der Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis* HÜBNER)

2.2.1 Verbreitung

Der Maiszünsler, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) ist in Europa heimisch. Als Schädling trat er früher unter anderem in Hanf, Hirse und Hopfen auf. Aus der Zeit vor 1895 gibt es keine Belege für bedeutende Schäden in der Landwirtschaft (Showers 1993). Um 1909 wurde der Maiszünsler aus Europa in die USA und Kanada eingeschleppt, wo er sich über die Ostküste und im Gebiet der Großen Seen explosionsartig ausbreitete und starke Schäden im Mais anrichtete (Showers et al. 1989). Heute ist er fast überall in den Maisanbaugebieten der USA anzutreffen und verursachte dort in den letzten Jahren Ernteverluste von jährlich bis zu 1 Milliarde US Dollar (Huang et al. 1999a). Der Maiszünsler wird mittlerweile auf allen fünf Erdteilen gefunden und gilt als einer der am meisten gefürchteten Schädlinge im Maisanbau. Weltweit werden die Ernteverluste auf 7% der Maisernte geschätzt. In Deutschland ist der Maiszünsler im Mais in Südwestdeutschland weit verbreitet. Das Auftreten und die Stärke des Befalls können regional stark schwanken. Seit etwa 30 Jahren wandert der Maiszünsler von den Verbreitungsgebieten in Süddeutschland nordwärts aus, so dass 1995 erste Larven in Bonn gefunden wurden (Langenbruch & Szewczyk 1995). Die derzeitige Nordgrenze seines Verbreitungsgebietes liegt im Westen Deutschlands auf einer Linie Köln - Jülich (Schmitz et al. 2001), verläuft dann südöstlich durch den Westerwald, weiter ostwärts in den südlichen Teil Thüringens und den Oderbruch. Nördlich davon gibt es einige Verbreitunginseln. Jährlich breitet sich der Maiszünsler bis zu 10-12 km in Richtung Norden aus (Schmitz et al. 2002). Mit einer dauerhaften Besiedlung der Köln-Bonner Bucht und der sich anschließenden Gebiete nordöstlich von Aachen ist in den nächsten Jahren zu rechnen. Kluge et al. (1999) beschreibt die 14° - Isotherme (Mittelwert aus Juni und Septembertemperatur) als natürliche Verbreitungsbarriere. Der Maiszünsler profitiert auch von der zunehmenden pfluglosen Bodenbearbeitung im Maisanbau, wodurch die Überwinterung in Wurzelstücken erleichtert wird.

In Deutschland treten zwei Rassen des Maiszünslers auf, die sogenannte „Z-Rasse“ und die „E-Rasse“, die sich in der chemischen Zusammensetzung des Sexualpheromons (11-Tetradecenylacetat) unterscheiden (Klun 1975), wobei die Weibchen der verschiedenen Rassen jeweils unterschiedliche Verhältnisse an E- und Z-Isomeren des Pheromons produzieren (Willett & Harrison 1999). Weiterhin bevorzugen die beiden Rassen höchstwahrscheinlich andere Futterpflanzen. Die Z-Rasse ist in Deutschland vorwiegend

vertreten und eng an den Mais adaptiert. Die E-Rasse ist mehr polyphag und besiedelt hauptsächlich dikotyle Pflanzen, wie Beifuss (*Artemisia vulgaris* L.) und Hopfen (*Humulus lupulus* L.). Grundsätzlich kann der Maiszünsler eine Vielzahl von Pflanzen besiedeln, deren Stängel dick genug für die Larven sind (Hudon et al. 1989). Insgesamt wurde bislang von 223 Pflanzenarten berichtet, in denen sich der Maiszünsler auf Dauer etablieren konnte (Lewis 1975). Die E-Rasse ist in ganz Deutschland anzutreffen und erreicht ihre nördlichen Verbreitungsgrenzen in Skandinavien. Dabei wird angenommen, dass sie im Gegensatz zur Z-Rasse in Deutschland keine wirtschaftliche Schadensbedeutung erlangt. Ein Übergreifen der E-Rasse auf den Mais kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (Lorenz 1993). Hybridisierung zwischen beiden Rassen ist möglich und im Labor nachgewiesen worden (Zhu et al. 1996), sowie im Freiland bei einem kleinen Prozentsatz zu beobachten (Linn et al. 1997).

2.2.2 Lebenszyklus und Entwicklung

Der Maiszünsler gehört zur Familie der Zünsler (Pyralidae; Systematik nach Karsholt & Razowski 1996). Die Körperlänge beträgt 12-14 mm. Das Männchen erreicht eine Flügelspannweite von 20-25 mm. Seine Vorderflügel sind gelb bis zimtbraun mit einem



Abb. 2.2: Verschiedene Entwicklungsstadien des Maiszünslers (A: Eigelege, B: L5-Larve, C: männlicher Falter)

hellen Mittelfleck und gelblichen Streifen. Die Flügelspannweite der Weibchen beträgt 25-30 mm, die Vorderflügel sind hell- bis ockergelb. Die Falter fliegen von Mitte Juni bis August meist in der Dämmerung und nachts. Ihre Lebensdauer beträgt nur etwa 10 Tage (Hill 1987). Hohe Luftfeuchtigkeit und Nahrungsaufnahme fördern die Fertilität und Lebensdauer der Falter (Leahy & Andow 1994). Das Weibchen legt mehrere Gelege mit etwa 20 Eiern an die Unterseite der Maisblätter. Die Eientwicklung dauert 7-12 Tage (Engel 1971). Schlüpfende Raupen fressen erst oberflächlich an den Blättern und breiten sich zu Nachbarpflanzen hin aus. Ihr Aktionsradius beträgt etwa 1,5 m. Ihre Ausbreitung ist auch mit Hilfe von Wind möglich, da sie sich an dünne Gespinnstfäden hängen und somit verweht werden können (Ackermann et al. 2003). Erst nach einigen Tagen bohren sie sich in den Schaft der Rispe.

Im Laufe der Vegetationsperiode fressen sie sich nach unten durch den Stängel. Die Larven durchlaufen vier Häutungsphasen (L1-L5). Univoltine Rassen (nur eine Generation pro Jahr) überwintern als Larvenstadium L5 in einem Zustand der Diapause im unteren Bereich des Stängels, in Wurzeln oder im Boden. Die Diapause wird definiert als ein genetisch festgelegter Zustand der Entwicklungsunterdrückung, der durch Umweltfaktoren induziert wird (Beck 1982). Die Diapause wird im Spätsommer eingeleitet, wenn die mittlere Photophase mehr als 15 Stunden pro Tag beträgt (Cagan 1998). Während der Überwinterung akkumulieren die Maiszünslerlarven Glycerol und werden dadurch kälteresistent. Auslöser der Glycerolzunahme ist dabei wahrscheinlich der einsetzende Kältestress im Herbst (Nordin et al. 1984). Im Frühjahr beginnt der Glycerolgehalt in den Larven abzunehmen. Die Verpuppung erfolgt in Deutschland ab Mitte Mai. Für die zunehmende Aktivität der Larven nach der Überwinterung ist hauptsächlich die Bodentemperatur verantwortlich. Im Juni schlüpfen die ersten Imagines. In Deutschland treten bislang nur univoltine Maiszünsler auf. In wärmeren Gebieten, wie etwa in Südeuropa, aber auch in weiten Teilen der USA hat der Maiszünsler mehrere Generationen im Jahr (Engel 1971).

Ein regulativer Einfluss auf Maiszünslerpopulationen bei hohem Befall kann von Mikrosporidien ausgehen (Pierce et al. 2001). Bei Mikrosporidien handelt es sich um eine Gruppe einzelliger Protozoen, die häufig als intrazelluläre Parasiten bei Insekten vorkommen und dann meist Sporenanhäufungen in den Geweben des Wirttieres bilden (Undeen 1997). Ökonomisch können sie als Pathogen bei der biologischen Kontrolle zur Verhinderung einer Ausbreitung von Schädlingen eine wichtige Rolle einnehmen (Malone & McIvor 1993). Der Maiszünsler wird hauptsächlich durch die Art *Nosema pyrausta* (Paillot) befallen (Microsporida: Nosematidae) (Baker et al. 1994). Die Übertragung der infektiösen Sporen kann von einem Individuum zum nächsten erfolgen, aber auch transovariell, also über die Eigelege an die nächste Generation weitergegeben werden. Mehr als die Hälfte aller transovariell infizierten Larven erreicht nicht das Puppenstadium (Solter et al. 1990). Mikrosporidien können die Populationen durch herabgesetzte Fitness schwächen (geringere Widerstandsfähigkeit, kürzere Lebensdauer adulter Tiere, verzögerte Entwicklung der Larven) und durch verringerte Fertilität die Reproduktionsrate senken (Ohnesorge 1992). Weiterhin wird die Wintermortalität durch Infektion mit Mikrosporidien erhöht (Langenbruch & Kleespies 1998). Inwiefern ein großflächiger Anbau von Bt-Mais Einfluss auf die Verbreitung von Mikrosporidien und ihre Bedeutung zur Kontrolle von Maiszünslerpopulationen ausübt, wird derzeit diskutiert.

Ein weiteres Insektenpathogen, das auf Maiszünsler wirkt, ist der Pilz *Beauveria bassiana* (Balsamo) (Deuteromycotina: Hyphomycetes) (Bing & Lewis 1993). Untersuchungen haben ergeben, dass auch andere natürliche Gegenspieler, wie generalistische Prädatoren, einen Einfluss auf Maiszünslerpopulationen ausüben können (Sparks et al. 1966, Phoofolo et al. 2001). Da die Larven die meiste Zeit innerhalb des Stängels verbringen, sind sie für die meisten Räuber und Parasitoide nur als Eigelege oder während des ersten Larvenstadiums zu erreichen (Obrycki et al. 1998; Zalucki et al. 2002). Aufgrund der hohen Reproduktionsrate des Maiszünsler sind die Gegenspieler allerdings nicht in der Lage die Populationen soweit zu schwächen, dass ein deutlicher Rückgang zu erkennen ist (Hudson & LeRoux 1986).

2.2.3 Schaden

Der Ertragsverlust durch den Maiszünsler liegt in Deutschland bei starkem Befall im Körnermais bei bis zu 20 % (Magg et al. 2002). Landesweit sind zur Zeit bereits etwa 300.000 ha Anbaufläche betroffen und eine deutlich Befallszunahme wird vor allem in Nordrhein-Westfalen, Thüringen, Sachsen und Brandenburg beobachtet (Degenhardt et al. 2003). Bei der Eiablage unterscheidet der Maiszünsler nicht zwischen Silomais und Körnermais (Ohnesorge 1992). Silomais wird aber in der Regel früher abgeerntet als Körnermais, so dass ein großer Teil der Larven mit der Ernte vom Feld entfernt werden (Langenbruch 1987). Die wirtschaftliche Schadensschwelle wird bei 10-15 Eigelegen oder 60-80 Raupen pro 100 Pflanzen erreicht. Eine Larve pro Pflanze soll etwa 4% Ertragsverlust verursachen (Hugger 1998). Der Schaden entsteht dabei hauptsächlich durch Stängelbruch und Abknicken des Kolbens, wie auf dem Foto in Abb. 2.3 deutlich wird. Durch Unterbrechung der Nährstoffbahnen kann eine Reifung verhindert werden. (Engel 1971). Im Silomais wird die Ernte durch Stängelbruch erheblich erschwert.



Abb. 2.3: Schaden am Mais durch abgeknickte Stängel

Außerdem erhöht sich bei Maiszünslerbefall die Anfälligkeit der Pflanzen gegenüber Pilzbefall, da der Pilz über die Fraßstellen der Raupen in die Maispflanzen eindringen kann (Mastel 2003). Dies kann zu einer deutlichen Belastung der Ernte mit Mykotoxinen führen, die für Mensch und Tier stark toxisch wirken können. Dabei werden in einigen Jahren sogar die Grenzwerte deutlich überschritten und die Ernte muss vernichtet werden. Hauptsächlich

handelt es sich um Arten, die Stängel- und Kolbenfäule verursachen (Magg et al. 2002). Derzeit sind keine Fungizide zur Pilzbekämpfung im Mais zugelassen (Mastel 2003).

2.2.4 Bekämpfung

Im Maisanbau kann der Maiszünsler als Hauptschädling durch Stängel- und Kolbenfraß finanziellen Schaden verursachen, dessen Höhe eine Insektizidbehandlung häufig unumgänglich macht. Allerdings ist in Deutschland derzeit nur noch das Präparat Baythroid (Wirkstoff Cyfluthrin) zur Maiszünslerbekämpfung zugelassen. Die direkte Bekämpfung des Maiszünslers mit Insektiziden ist nur während der kurzen Zeit möglich, in der sich die Larven noch nicht in den Maisstängel eingebohrt haben. Während dieses Zeitraums kann der Maiszünsler ebenfalls mit Bt-Präparaten bekämpft werden, was eine Alternative zur Behandlung mit synthetischen Insektiziden darstellt. Allerdings konnte sich der Einsatz von Bt Präparaten als biologisches Verfahren auf Grund hoher Kosten bislang nicht durchsetzen (Wührer 2002).

Eine andere biologische Bekämpfungsmethode, die weitaus häufiger zum Einsatz kommt, ist der Einsatz von Schlupfwespen (*Trichogramma evanescens* und *Trichogramma brassica*). Sie werden seit den achtziger Jahren in Deutschland gegen den Maiszünsler eingesetzt. Ihr Vorteil ist, dass sie als Eiparasiten schon die Eier des Maiszünslers abtöten und so ein Schlüpfen der Larven und daraus resultierender Schadfraß von Vorneherein verhindert wird. Nachteilig sind die hohen Kosten und die aufwendige Handhabung. Außerdem ist die Wirkung stark witterungsabhängig (Degenhardt et al. 2003). Eine weitere Pflanzenschutzmaßnahme ist das tiefe Abhäckseln der Maispflanzen bei der Ernte. Maisstängel und Stoppeln sollten durch rotierende Bodenbearbeitungsgeräte zerschlagen werden, um die Raupen weitgehend zu vernichten (Ackermann et al. 2003). Nach der Ernte sollten Maisstoppeln und Maisstroh, wenn möglich, tief untergepflügt werden, um die Wintermortalität zu erhöhen (Zellner 2001). Durch die Entwicklung neuer Pflanzenschutzstrategien ist die Herstellung transgener Pflanzen möglich geworden, die sich durch die Produktion eines lepidopterenschädigenden Toxins aus Bakterien selbst gegen Fraß durch Maiszünslerlarven wehren können. In den folgenden Kapiteln soll darauf näher eingegangen werden.

2.3 *Bacillus thuringiensis*

2.3.1 Allgemeines

Bacillus thuringiensis ist ein ubiquitär vorkommender Sporenbildner, mit insektenpathogenen Eigenschaften. Während der stationären Phase bildet er einen parasporalen Kristall, dem hauptsächlich die insektizide Wirkung zugeschrieben wird (Schnepf et al. 1998; Glare & O’Gallaghan 2000). In dieser Wachstumsphase werden spezielle Toxine, die δ -Endotoxine oder Cry-Proteine synthetisiert und in der Zelle akkumuliert. Dabei wird ein kristalliner Einschluss gebildet, der am Ende der Sporulation ins umgebende Medium ausgeschieden wird (Lereclus et al. 2000). Dieser Kristalleinschluss kann bis zu 25% der Trockenmasse der Bakterienzelle ausmachen. *B. thuringiensis* ist ein häufiges Bakterium der Bodenmikroflora und kann aus fast allen terrestrischen Habitaten isoliert werden. Im Boden können *B. thuringiensis*-Sporen für längere Zeit überleben. Untersuchungen von Bodenproben zeigten eine Überlebensdauer der Sporen von bis zu 24 Monaten (Smith & Barry 1998).

2.3.2 Systematik

Innerhalb der Gruppe der Gram-positiven Eubakterien wird *Bacillus thuringiensis* in die Familie der Bacillaceae eingeordnet. Er gehört zur *Bacillus cereus* Gruppe, zu der auch hoch pathogene Bakterien wie *Bacillus anthracis* zählen. Die verschiedenen Varietäten (Subspezies) werden durch Serotypisierung auf der Basis von Flagellenantigenen, den sogenannten H-Antigenen klassifiziert (Glare und O’Gallaghan 2000). Die insektizide Wirkung ist auf bestimmte Gruppen von Wirten beschränkt. Drei Serotypen (oder auch Pathotypen) mit unterschiedlichem Wirtsbereich sind von kommerzieller Bedeutung:

Bacillus thuringiensis var.:

- <i>kurstaki</i> (Pathotyp A)	gegen Lepidopteren
- <i>israelensis</i> (Pathotyp B)	gegen Dipteren
- <i>tenebrionis</i> (Pathotyp C)	gegen Coleopteren

Da von den unterschiedlichen *B. thuringiensis*-Stämmen eine Vielfalt verschiedener Cry-Proteine synthetisiert werden, die jeweils unterschiedliche Wirtsbereiche schädigen, entwickelten Höfte und Whiteley 1989 eine systematische Nomenklatur für die bekannten Endotoxine, die hauptsächlich aufgrund der Wirkung, also dem Insektizidspektrum, unterteilt (Van Rie 2000). Seit dem hat sich jedoch die Zahl der sequenzierten cry Gene derartig erhöht, dass eine überarbeitete Nomenklatur notwendig wurde. Dieses neue System basiert auf der jeweiligen Aminosäuresequenz der Toxine, womit sich anhand der Sequenzhomologie der Cry-Proteine phylogenetische Stammbäume erstellen lassen. Basierend auf diesem System werden die bislang identifizierten 169 Proteine in 28 Cry-Klassen und 2 Cyt-Klassen eingeteilt (Crickmore et al. 1998). Nach dieser Einteilung finden

sich die lepidopteren-spezifischen Toxine in der Cry1 Unterklasse. Zur Bekämpfung des Maiszünslers wird neben Cry1Ac, besonders Cry1Ab verwendet.

2.3.3 Wirkungsmechanismus

Nach Aufnahme der Sporen durch die Insektenlarve wird im alkalischen Darmtrakt das Protoxin durch Auflösung der parasporalen Kristallstruktur freigesetzt. Das 120-140 kDa große Protoxin wird durch enzymatische Spaltung zu dem insektiziden δ -Endotoxin umgewandelt und bindet als 55-65 kDa große, aktive Form an spezifische Rezeptoren in der Darmwand. Bei Lepidopterenlarven sind hierfür besonders Trypsin-ähnliche Proteasen des Mitteldarms verantwortlich, die am C-Terminus des Protoxins beginnen (Huang et al. 1999b). Spezifische Rezeptoren am Mikrovillisaum des Darmepithels binden dieses verkürzte Toxin, das sich zum Teil in die Membran integriert und damit die Ausbildung von Ionenkanälen hervorruft. Die Durchlässigkeit für K^+ -Ionen steigt dadurch an und dies bedingt den Zusammenbruch des osmotischen Gleichgewichts im Darm der Larve. Durch vermehrte Wasseraufnahme kommt es zur Zellauflösung der Epithelzellen. Dies führt zu einer Darmparalyse und anschließender Perforation des Darms, womit eine Vermischung von Hämolymphe und Darmgewebe eintritt. Hierdurch entsteht eine Sepsis im Körper des Wirtes, die innerhalb weniger Tage den Tod des Insektes zur Folge hat. Im Allgemeinen tritt schon 24 Stunden nach Aufnahme des Toxins ein Fraßstop ein. Die nötige Dosis liegt bei 10^3 bis 10^4 Sporen und Kristallen pro Larve.

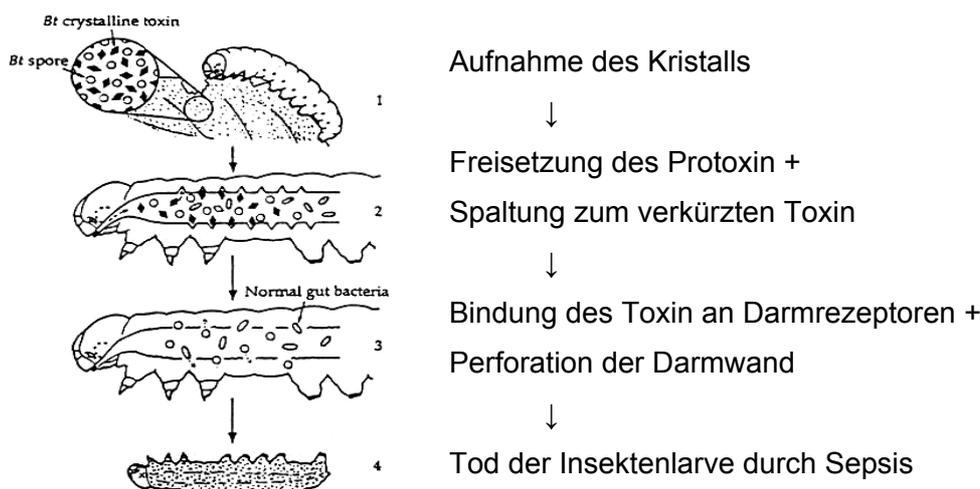


Abb. 2.4: vereinfachter Wirkungsmechanismus des Cry-Toxins bei einer Lepidopterenlarve

2.3.4 Struktur und Funktion

B. thuringiensis Stämme besitzen eine Genomgröße von 2,4 – 5,7 Millionen Basenpaaren. Die Gene, die für die Cry-Proteine codieren, befinden sich auf extrachromosomalen ringförmigen DNA-Strukturen, den Plasmiden. Ihre Genexpression findet während der stationären Phase statt (Schnepf et al. 1998).

Die meisten Cry-Proteine sind Protoxine mit einer Länge von etwa 125-140 kDa (Van Rie 2000). Das lepidopteren-spezifische Cry1A Toxin besteht aus 3 Domänen mit unterschiedlichen Strukturen. Domäne I ist in sieben antiparallele α -Helices unterteilt, Domäne II besteht aus drei antiparallelen β -Faltblättern. Domäne III ist ebenfalls aus β -Faltblättern aufgebaut, wobei hier allerdings eine sandwichartige Struktur geformt wird.

Zusätzlich zu den Cry-Proteine, die auch als „insecticidal crystal proteins“ (ICPs) bezeichnet werden, bilden einige Bt-Stämme außerdem noch andere Proteine, die „vegetative insecticidal proteins“ (VIPs) während der vegetativen Wachstumsphase, die ebenfalls den Insekten Darm schädigen (Yu et al. 1997). Auch die von *B. thuringiensis* produzierten Exoenzyme spielen eine Rolle in der Insektenpathogenität der Bakterien. Allerdings werden zur Zeit nur ICP Gene zur Insektenkontrolle eingesetzt (Van Rie 2000).

2.3.5 Anwendungsbereiche und Produktion

Bt-Spritzpräparate sind die am häufigsten verwendeten Biopestizide weltweit und werden für eine Reihe unterschiedlicher Schädlinge, sowohl in der Forst-, wie auch in der Landwirtschaft eingesetzt (Glare & O’Gallaghan 2000). In Deutschland haben Bt-Präparate heutzutage hauptsächlich im ökologischen Landbau eine größere Bedeutung. Bt-Präparate sind seit 1964 amtlich in Deutschland zugelassen. Gründliche toxikologische Untersuchungen zeigten bislang keine Gefahr für den Menschen, ebenso ist auch für andere Säugetiere, Vögel und Fische keine Toxizität festgestellt worden. Da das δ -Endotoxin zur Aktivierung ein alkalisches Milieu benötigt ($\text{pH} > 12$), sind die Bedingungen im nicht-alkalischen Säugetierdarm ungünstig und die toxische Wirkung bleibt aus. Viele als indifferent oder nützlich eingestufte Bakterien werden nicht geschädigt (Glare & O’Gallaghan 2000). Nachteile bei der Anwendung von Bt-Spritzmitteln sind der schnelle Abbau der Sporen durch UV-Licht, die Abwaschung durch Regenwasser und der geringe Wirkungsgrad gegenüber schon im Stängel eingehohten Larven (High et al. 2002).

Für die Produktion wird *B. thuringiensis* in großen Fermentern vermehrt, die gebildete Biomasse großtechnisch filtriert und getrocknet. In den USA werden transgene

Bakterienkulturen, wie *Bacillus subtilis* und *Pseudomonas*-Stämme für die industrielle Großproduktion von Bt-Toxinen benutzt.

Typischerweise enthalten die kommerziellen Bt-Produkte aus *B. thuringiensis* gegen Lepidopteren (wie etwa Dipel) fünf Toxine: Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry2A und Cry2B (Tabashnik et al. 1997). Das ebenfalls häufig eingesetzte Spritzmittel MVP dagegen enthält nur Cry 1Ac.

2.3.6 Bt-Gene in Kulturpflanzen

Für die Herstellung gentechnisch veränderter Pflanzen nutzt man die Erkenntnis, dass die einzelnen Toxine für ganz bestimmte Schadinsektenarten besonders toxisch sind. Gegen den Maiszünsler ist das Toxin Cry1Ab besonders wirksam. Von der Vielzahl an spezifischen cry-Genen wurden einige mit Hilfe gentechnischer Methoden in bislang etwa 30 verschiedene Kulturpflanzen eingebracht, die dadurch in der Lage sind das spezifische Bt-Toxin in ihren Pflanzenteilen zu exprimieren und sich damit wirksam gegen Fraß durch entsprechende Schadinsekten zu schützen. Neben Herbizidresistenz ist Insektenresistenz das zweithäufigste übertragene Merkmal transgener Pflanzen und Bt-Toxingene sind erfolgreich in 26 verschiedenen Nutzpflanzen eingebracht worden (Schuler et al. 1998).

Bei drei Kulturpflanzen (Mais, Baumwolle und Kartoffel) sind bereits transgene Sorten in den Verkehr gebracht worden. Andere Bt-Nutzpflanzen wie Reis, Raps und verschiedene Gemüse stehen kurz vor der Kommerzialisierung (Moar & Schwartz 2003). In den USA wurden im Jahr 2002 auf einer Fläche von 10 Millionen ha Bt Maispflanzen angebaut. Nach Angaben der amerikanischen Landwirtschaftsbehörde USDA (United States Department of Agriculture) ist für das Jahr 2003 ein Zuwachs bei insektenresistenten Maissorten zu beobachten, wobei der Anteil von Bt-Mais an der Gesamtanbaufläche von 22 % im Vorjahr auf 26 % im Jahr 2003 anstieg (National Agricultural Statistics Service 2003). Weltweit besitzen 22 % aller landwirtschaftlich genutzten gentechnisch veränderten Pflanzen eine Insektenresistenz, die auf Bt Toxine basiert. Mit fast 99% wird der Hauptanteil transgener Pflanzen in den USA, Kanada, China und Argentinien angebaut. Beim Mais stammen 9% der Weltproduktion aus gentechnisch veränderten Sorten, wobei das Merkmal der Insektenresistenz überwiegt. Im Jahr 2002 wurde Bt Mais in sechs Ländern (USA, Kanada, Argentinien, Spanien, Südafrika und Bulgarien) zur kommerziellen Nutzung gepflanzt (James 2002). Innerhalb der EU wird nur in Spanien auf einer Fläche von derzeit etwa 20.000 ha Bt Mais kommerziell angebaut. In Deutschland ist ein begrenzter Anbau (etwa 500 ha) im Rahmen von Sortenprüfungen und wissenschaftlichen Untersuchungen genehmigt.

Beim 1995 erstmals zugelassenen Event Bt 176 (Novartis, Greensboro, NC, USA) wurde ein synthetisches Gen für eine verkürzte Form des Cry1Ab Endotoxins mit Hilfe von Mikroprojektilbombardement in Maisembryos eingebracht. Der G-C Gehalt des nativen Cry1Ab-Gens wurde erhöht, um eine bessere Expression des Gens in Maispflanzen zu erreichen und stimmt nur noch zu 65 % mit der Nucleotidsequenz des nativen Gens überein (Koziel et al. 1993). Event Bt 176 besitzt zwei gewebespezifische Promotoren um die Expression des Cry1Ab-Gens zu kontrollieren, zum einen den maisspezifischen PEPC-Promotor, der für eine Expression in grünen Pflanzenteilen verantwortlich ist, zum anderen einen pollenspezifischen CDPK-Promotor aus Mais. Zusätzlich wird eine Phosphinothricinresistenz (*bar*-Gen) und eine Antibiotikaresistenz gegenüber Ampicillin (*bla*-Gen) als selektiver Marker genutzt (Chiueh et al. 2000). Der transgene Mais MaisGard™ (oder YieldGard™) des Saatgutherstellers Monsanto wurde 1996 in den USA zugelassen. Die Linie MON 810 (Monsanto, St. Louis, MO, USA) enthält ein modifiziertes Cry1Ab-Gen unter der Kontrolle des 35S-Promotors des Cauliflowermosaikvirus und eines NOS-Terminators aus dem Nopalinsynthasegen von *A. tumefaciens* (EPA 2003). Die Sequenz wird am 5' -Ende flankiert vom Intron 1 des maisspezifischen Hitzeschockproteins 70 (Zimmermann et al. 1998). Dies neu eingebrachte Gen führt zur Expression einer verkürzten Version des Cry1Ab δ -Endotoxins (63 kD). Zusätzliche Markergenprodukte werden nicht expremiert (Mendelsohn et al. 2003).

2.3.7 Resistenzproblematik

Resistenz wird definiert als die genetisch bedingte Widerstandsfähigkeit eines Organismus gegenüber Umwelteinflüssen oder anderen Organismen oder ihren Giften. Im Gegensatz zur Toleranz, die eine im Laufe der Entwicklung erworbene Widerstandsfähigkeit bezeichnet, beruht die Resistenz auf Mutation und Selektion gegenüber einem Umweltfaktor (Streit 1991). Da etwa 500 Schadinsektenarten bisher Resistenzen gegen konventionelle Insektizide entwickelt haben, muss auch die Resistenzentwicklung bei Schadinsekten gegenüber den Bt-Toxinen als eine mögliche Entwicklung angesehen werden (McGaughey & Whalon 1992). Diese könnte durch einen ungeeigneten Umgang mit Bt-Pflanzen leichtfertig provoziert werden. Vor allem bei einem großflächigem Anbau von Bt-Pflanzen ist mit dem Auftauchen resistenter Schadinsekten zu rechnen, die sich auf Grund des starken Selektionsdruckes schnell ausbreiten würden. Durch die schnelle und extensive Ausbreitung von Bt-Pflanzen in einigen Ländern hat sich das Risiko einer Adaptierung der entsprechenden Schadinsekten an die Bt-Toxine erhöht (Gould 1998). Damit wären nicht nur

transgene Bt-Pflanzen (Carriere et al. 2003), sondern auch herkömmliche Bt-Präparate unwirksam.

Die Wirksamkeit und Spezifität der verschiedenen Bt-Gene und Bt-Proteine muss als Ressource einer gezielten Insektenbekämpfung betrachtet werden und sollte nicht durch den unüberlegten Einsatz transgener Bt Pflanzen gefährdet werden (Bartsch & Schuphan 2000, Mendelsohn et al. 2003).

Der erste Bericht über eine im Freiland aufgetretene Resistenz gegenüber Bt-Präparaten stammt aus Hawaii, wo verschiedene Stämme der Kohlschabe (*Plutella xylostella*; Lepidoptera: Plutellidae) eine deutliche Resistenz gegenüber dem Bt-Spritzmittel Dipel aufwiesen (Tabashnik et al. 1990). Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Bindung des Toxins im Darm stark herabgesetzt war. Von ähnlichen Resistenzentwicklungen bei *P. xylostella* wurde auch von den Philippinen berichtet (Ferre et al. 1991). In Laborzuchten wurde unter hohem Selektionsdruck bei verschiedenen Lepidopterenarten eine Resistenz gegenüber Bt Endotoxinen festgestellt. Nach nur 7 Generationen konnte beim Maiszünsler eine 73fach erhöhte Resistenz gegenüber dem Spritzmittel Dipel (Huang et al. 1997) im Labor erreicht werden.

Grundsätzlich können Resistenzen bei verschiedenen Stufen im Wirkmechanismus von Bt entstehen: Aufnahme (Verhaltensresistenz) und Auflösung, proteolytische Prozessierung, Passage durch peritrophische Membran, Rezeptorbindung, Porenformation und osmotische Lyse der Darmzellen. Bei den meisten bisher aufgetretenen Resistenzen gegenüber Bt handelt es sich aber um Änderungen bei der Rezeptorbindung (Ferre & Van Rie 2002).

Um die Entstehung von Resistenzen gegenüber Bt-Toxinen zu verlangsamen, sind Strategien für ein Resistenzmanagement nötig. Umfangreiche Konzepte zum Management von Schädlingsresistenzen liegen aus den USA vor (Siegfried 2000). Für ein sogenanntes „Insect Resistance Management (IRM)“ beim Anbau von Bt-Maispflanzen wird die von Alstad und Andow (1995) entwickelte „high-dose/refuge strategy“ derzeit favorisiert (Zoerb et al. 2003). Bei diesem Ansatz sollen durch eine hohe Dosis des Toxins in der Pflanze sämtliche homozygot suszeptiblen und die meisten heterozygoten Individuen getötet werden, so dass allenfalls einige seltene homozygot resistente Insekten überleben. Ein Refugium aus nicht-transgenen Pflanzen in direkter Nähe zum transgenen Feld stellt eine hohe Anzahl homozygot suszeptibler Genotypen zur Verfügung, um sich mit den homozygot resistenten zu paaren. Die Voraussetzung für diesen Ansatz ist ein hoher Genaustausch innerhalb der Flächen. Eine Rolle spielt dabei auch ein möglicher Genfluss zwischen E- und Z-Rasse (Bourguet et al. 2000b).

Eine der wichtigsten Annahmen dieses theoretischen Modells geht davon aus, dass die Allele, die Resistenz vermitteln, selten sind und mit einer Häufigkeit von $<10^{-3}$ in Maiszünslerpopulationen vorkommen (Roush 1994). Bourguet et al. (2003) konnten in ersten Untersuchungen französischer Maiszünsler eine Häufigkeit der Resistenzallele von $< 9,2 \times 10^{-4}$ bestimmen. Diese vorläufigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Resistenzallele selten genug vorkommen könnten, um die Resistenzentwicklung durch eine „high-dose/refuge strategy“ deutlich zu verzögern. Genauere Daten zum genetischen Hintergrund und zur Populationsstruktur europäischer Maiszünslerbestände sind erforderlich, um bessere Aussagen für ein Resistenzmanagement in Europa machen zu können.

3. Material und Methoden

3.1 Maiszünlersammlung

Mit der Sammlung von Maiszünlern und dem Aufbau einer eigenen Laborzucht wurde im Sommer 1999 an den Standorten im mittleren Rheintal (Lidolsheim und Walldorf) begonnen. Im Herbst des selben Jahres wurden im Gebiet Bodensee und oberes Rheintal (Breisgau und Ortenau) im Rahmen einer Bonitur des Pflanzenschutzdienstes Freiburg L5-Larven aus Maisstängeln und Kolben gesammelt. Die genauen Standorte der Larvensammlung sind Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Tab 3.1: Übersicht über die einzelnen Standorte für die Sammlung von überwinternden L5-Larven

Bezeichnung	Standort	Breitengrad	Längengrad	Höhe ü. NN	Jahr	Anbau
Oberes Rheintal (Breisgau/Ortenau) (Freiburg) F	Bremgarten	N 47°54,817'	E 007°37,240'	251 m	1999	Körnermais
	Wyhl	N 48°09,619'	E 007°40,220'	254 m	1999	Silomais
	Hartheim	N 47°57,121'	E 007°38,633'	259 m	1999	Körnermais
	Wittenweiher	N 48°19,194'	E 007°45,422'	243 m	1999	Körnermais
Mittleres Rheintal (nördl. Karlsruhe) K	Walldorf	N 49°18,578'	E 008°37,633'	133 m	1999	Silomais
	Lidolsheim	N 49°10'	E 008°24'	100 m	1999	Silomais
Unteres Rheintal (bei Bonn) N	BN-	N 50°44,862'	E 007°02,147'	64 m	2000	Beifuss
	Tannenbusch				2001	(<i>Artemisia vulgaris</i>)
Bodensee B	Gottmadingen	N 47°44,294'	E 008°45,899'	450 m	1999	Körnermais
	Nenzingen	N 47°50,967'	E 008°56,581'	412 m	1999	Silomais
	Wahlwies				1999	Zuckermals

Beim Vergleich der beiden Sammelstrategien erwies sich das Sammeln der Eigelege mit Hilfe von Lichtfallen als zweckmäßiger, da bei einer Sammlung im Herbst die Larven in die Diapause gehen und erst im darauf folgenden Sommer weitergezüchtet werden können. Zudem muss mit einer hohen Mortalität bei der Überwinterung gerechnet werden. Versuche aus dem Jahr 1999, die Diapause nach 100 Tagen bei 10°C zu brechen, führten zu erheblichen Verlusten und einer verzögerten Verpuppung. Aus diesem Grund wurden in den darauf folgenden Jahren nur noch Eigelege gesammelt.



Abb. 3.1: Karte der geographischen Lage der einzelnen Sammelstandorte für die verschiedenen Maiszünslerpopulationen.

In Tabelle 3.2 sind die genauen Fallenstandorte aufgelistet. Zur besseren Übersicht über die Lage der untersuchten geographischen Regionen sind die Sammelgebiete auf der Karte in Abb. 3.1 eingetragen (Maiszünslersymbole). An den beiden ostdeutschen Standorte wurden überwinterte L5-Larven von der BBA Kleinmachnow gesammelt und uns für die molekularbiologischen Diversitätsuntersuchungen zur Verfügung gestellt.

Die von uns verwendeten Lichtfallen lockten die Falter an, die nach dem Fang automatisch in Käfige geführt wurden, wo sie auf vorhandene Maispflanzen ihre Eier legten. Für diese Sammelmethode wurden zwei verschiedene Arten von Fallen konzipiert. Bei Fallentyp 1 handelte es sich um eine Kastenfalle mit den Maßen 2 m x 1,50 m x 2 m über die ein rechteckiges Moskitonetz gespannt wird. Fallentyp 2 ist eine Zeltfalle, bei der das Moskitonetz nur oben an der Lampe befestigt wird und unten mit Heringen am Boden gespannt wird. Die Fanglampe wird mit einem Galgen außerhalb befestigt. Beide Fallenarten sind in Abb. 3. 2 dargestellt. Die Lampen sind nach einer Vorlage des Pflanzenschutzamtes Karlsruhe hergestellt worden. In beiden Fallentypen wurde ein Schwarzlicht-Neonröhre der Firma Philipps TLD 15W/05 verwendet.

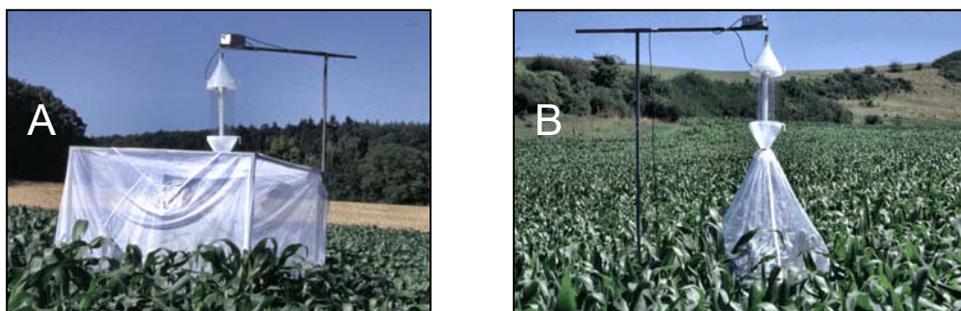


Abb. 3.2: Lichtfallen mit Fangkäfig (A) oder Fangnetz (B) zum Lebendfang von Maiszünslern und anschließendem Absammeln ihrer Eigelege.

Die Eigelege konnten direkt von den Maispflanzen im Fangkäfig entnommen werden und wurden in Kühltaschen nach Aachen transportiert. Die daraus schlüpfenden Larven wurden für die Zucht oder die Toxizitätstests verwendet.

Tab. 3.2: Standorte der Lichtfallen

Bezeichnung der Population	Fallenstandort	Breitengrad	Längengrad	Höhe ü. NN	Sammeljahr	
F	Oberes Rheintal (Freiburg)	Endingen (Wilhelmshöfe)	N 48°09,223'	E 007°43,203'	171 m	2000/2001
		Riegel (Romanshöfe)	N 48°09,764'	E 007°43,648'	181 m	2000/2001
		Forchheim (Petershöfe)	N 48°09,573'	E 007°40,154'	250 m	2001
		Wyhl	N 48°09,619'	E 007°40,220'	254 m	2000/2001
		Oberriemsingen	N 47°58,629'	E 007°40,029'	212 m	2000
K	Mittleres Rheintal (nördl. von Karlsruhe)	Ladenburg	N 49,28'	E 008°36'		2000
		Lidolsheim	N 49°,10'	E 008°24'	100 m	1999/2000
		Walldorf	N 49°18,578'	E 008°37,633'	136 m	1999/2000
N	Unteres Rheintal (bei Bonn)	Alfter (Borkeshof)	N 50°46,216'	E 007°616,35'		2001
		Euskirchen (Raiffeisen)	N 50°37,712'	E 006°53,125'	204 m	2001
		Oberdrees	N 50°38,188'	E 006°55,448'	194 m	2001
B	Bodensee	Gottmadingen	N 47°44,298'	E 008°45,759'	447 m	2000/2001
		Hilzingen	N 47°46,691'	E 008°46,168'	569 m	2000/2001
		Nenzingen	N 47°50,857'	E 008°56,737'	478 m	2000/2001

In jeder Region, in der eine Population gesammelt werden sollte, wurden an mindestens drei verschiedenen Standorten pro Sammeljahr Lichtfallen mit Fangkäfigen aufgestellt, um eine möglichst hohe Variabilität der einzelnen geographischen Regionen untersuchen zu können. In Abb. 3.3 ist eine Skizze der Region Oberes Rheintal/Freiburg als Beispiel für eine Verteilung der drei Fallenstandorte innerhalb einer Region dargestellt.



Abb. 3.3: Karte eines Sammelgebietes mit den drei Sammelstandorten (markiert mit einem blauen Quadrat) am Beispiel des Standortes Oberes Rheintal/Freiburg.

Insgesamt wurden dementsprechend vier repräsentative Regionen aus dem südwestlichen Verbreitungsgebiet des Maiszünslers in Absprache mit den Kooperationspartnern im Institut für biologischen Pflanzenschutz der Biologischen Bundesanstalt (BBA) ausgewählt: Unteres Rheintal (20 km im Umkreis von **Bonn**), Mittleres Rheintal (20 km im Umkreis von **Karlsruhe**), Oberes Rheintal (20 km im Umkreis von **Freiburg**) und **Bodensee** (20 km im Umkreis von Singen). Die Tiere aus einzelnen Sammelorten einer Region wurden zu einer einzigen Population vereinigt und nach den vier Sammelregionen getrennt gehalten, um differenzierte Untersuchungen zu ermöglichen. Im Folgenden gilt der Begriff *Population* also immer für die gesammelten Individuen aus einer geographischen Region im Umkreis von etwa 20 km.

Von der Beifuss-Rasse wurden dagegen weiterhin nur Larven gesammelt, um eine Vermischung durch zufällig angelockte Individuen der Mais-Rasse zu vermeiden. Bei der Beifuss-Rasse handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um die sogenannte E-Rasse, die sich von der Z-Rasse (= Mais-Rasse) nur in der Zusammensetzung der Pheromone unterscheidet. Diese außerhalb von Maisfeldern vorkommenden Maiszünslerp Populationen könnten als mögliche Kreuzungspartner und damit als Reservoir für Suszeptibilitäts-Allele in einem zukünftigen Resistenzmanagement von Bedeutung sein. Aus diesem Grund wurden diese Populationen mit in die Suszeptibilitätsprüfung und die genetische Charakterisierung eingeschlossen.

3.2 Laborzucht

Die Zucht der Maiszünsler fand in klimatisierten Zuchtschränken statt. Die Aufzucht der Larven erfolgte getrennt von den adulten Tieren, da hier unterschiedliche Bedingungen erforderlich sind (Guthrie et al. 1985). Um die Maiszünsler auf mögliche molekularbiologische und physiologische Unterschiede zwischen den einzelnen Herkünften zu untersuchen, wurden die gesammelten Tiere und ihre Nachkommen nach Sammelstandorten getrennt gehalten.

Tab. 3.3: Einstellungen der Klimaschränke für die Larvenaufzucht und die Haltung der Falter (modifiziert nach Wyninger 1997)

Klimaschrank	Photoperiode	Temperatur	relative Luftfeuchtigkeit
1: Larvenaufzucht	L:D 16:8 700 Lux	25°C Tag \pm 1°C 22°C Nacht \pm 1°C	70 %
2: adulte Tiere	L:D 16:8 4200 Lux	22°C Tag \pm 1°C 20°C Nacht \pm 1°C	70 %

Die niedrigere Temperatur in den Klimaschränken der Falter führte zu einer erhöhten Eiablage und gleichzeitigen Zunahme der Gelegegröße. Die Temperatur und Lichtverhältnisse in den Klimaschränken zur Larvenaufzucht verhindern ein Eintreten der Diapause während der Larvenentwicklung und ermöglichen damit ein kontinuierliches Züchten des Maiszünslers. Die genaue Einstellung der beiden verwendeten Klimaschränke ist Tab. 3.3 zu entnehmen.

Die Falter wurden in einen Flugkäfig gebracht, dessen Seitenwand aus engmaschiger Gaze bestand. An der Rückwand wurde eine durchsichtige Plastikfolie zur Eiablage befestigt. Diese Folie wurde alle zwei Tage gewechselt und die auf ihr festhaftenden Eigelege ausgeschnitten. Als Futter wurde in 10% Honigwasser getränkter Zellstoff in kleinen Gefäßen angeboten, um die Lebensdauer der Falter zu erhöhen (Leahy & Andow 1994; Fadamiro & Baker 1998). Jeweils 4-5 der ausgeschnittenen Eigelege wurden in eine Petrischale mit Nährmediumblocken gegeben. Die einzelnen Bestandteile für das verwendete Nährmedium sind in Tab. 3.4 aufgelistet (EU Draft protocol 1999). Ein befeuchtetes Papiertuch über der Petrischale verhinderte ein Austrocknen der Eier und der geschlüpften L1-Larven. Nach etwa einer Woche wurden die Larven in neue Petrischalen umgesetzt (etwa 10–15 pro Petrischale) und frisches Futter dazugegeben. Dies wiederholte sich bis zur Verpuppung. Nach der Verpuppung wurden die Puppen in Plastikdöschen mit Filterpapier überführt. Die Puppenruhe dauerte durchschnittlich 10 Tage. In der Regel benötigten die Larven unter Zuchtbedingungen etwa 25-30 Tage für ihre Entwicklung. In jeder Generation wurde ein Teil

der Falter nach der Eiablage, bzw. nach der Paarung in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und bei -20°C eingefroren, um daraus DNA für molekularbiologische Untersuchungen zu isolieren.

Alle Herstellernachweise und Firmennamen der einzelnen Chemikalien und Geräte können den jeweiligen Tabellen am Kapitelende entnommen werden.

Um eine Kontamination von Pathogenen (wie etwa Mikrosporidien) oder Schimmelpilzen zu minimieren und zur Einhaltung genereller hygienischer Arbeitsmethoden wurde eine tägliche Desinfektion aller verwendeten Materialien und Arbeitsflächen mit 70%igem Ethanol und einer 1 %igen Kohrsolinlösung durchgeführt. Bei erhöhtem Mikrosporidienbefall zu Beginn der Zucht wurde zusätzlich eine 0,25 %ige Natriumhypochloridlösung zur Sterilisation aller Arbeitsmaterialien und gegebenenfalls auch der Eigelege eingesetzt (Undeen 1997).

Tab. 3.4: Bestandteile des Nährmediums zur Aufzucht von Maiszünslern

Zutaten	einzusetzende Menge
Agar Agar	16 g
Wasser (1) für Agar Agar	340 ml
Wasser (2)	340 ml
Maisgrieß (Polenta)	112 g
Weizenkeime	28 g
Bierhefe	30 g
Ascorbinsäure	6 g
Benzoessäure	2 g
Sorbinsäure	0,8 g
Vitaminmischung	2 g
Fumidil	1 g
Aureomycin (Chlortetracyclin)	0,4 g

Wasser (1) wurde mit Agar in der Mikrowelle mehrmals zum Kochen gebracht. Die Benzoessäure wurde in etwas Ethanol aufgelöst und dann mit Ascorbinsäure, Fumidil, Chlortetracyclin, Vitaminmischung und Sorbinsäure unter Rühren in Wasser gelöst. Die restlichen Zutaten wurden abgewogen und mit Wasser (2) und dem heißen Agar mit einem

Stabmixer gründlich vermischt. Nach dem Abkühlen konnten die auf dem Magnetrührer gelösten Chemikalien untergemischt werden. Das Medium wurde noch flüssig in Plastischalen gegossen und nach dem Erkalten im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Fumidil wurde zur Unterdrückung von Mikrosporidien (*N. pyrausta*) eingesetzt (siehe Kap. 2.2.2). Ohne die Zugabe von Fumidil bestand die Gefahr einer raschen Zunahme dieser Protozoen, die einen erheblichen Einfluss auf die Anzahl und Qualität der Eigelege, sowie die generelle Fitness der Maiszünsler haben können (Lewis & Lynch 1970). Benzoesäure und Sorbinsäure verhinderten das Wachstum von Pilzen, wie *Aspergillus niger*, *A. flavus* und *Cladosporium avellaneum*. Die Beimischung des Antibiotikum Chlortetracyclin sollte die Zunahme von Bakterien kontrollieren (Guthrie et al. 1985).

Tab. 3.5 : Verwendete Geräte und Chemikalien für die Insektenzucht

- Insektenzuchtkasten (Erle) 60 x 30 x30 cm,	
- (Maschenweite 1,5 mm)	Bioform
- Petrischalen Ø 90 mm, ohne Nocken	Roth
- Klimaschrank KBWF 720	Binder
- Plastikbecher Ø 7 cm, Höhe 6 cm	Fleischereibedarf Geller
- Filterpapier MN 615 Ø 7 cm	Macherey & Nagel
- Agar Agar, dänisch pulverisiert	Roth
- Maisgrieß, Weizenkeime	HeissMühle
- Bierhefeflocken	Ramspeck
- Benzoesäure	Roth
- Sorbinsäure (C ₆ H ₇ O ₂ K)	ICN Biomedicals
- Chlortetracyclin	ICN Biomedicals
- Vitamin Diet Fortification Mixture	ICN Biomedicals
- Fumidil B (Bicyclohexylaminfumagillin)	Sanofi
- Mikrowelle	LG Multiwave
- Stabmixer	Moulinex
- Heiz- und Magnetrührer Ikamag® RH	Ika-Labortechnik
- Kohrsolin FF® 1%	Bode Chemie
- Natriumhypochlorid (NaOCl)	Merck
- 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf

3.3 Untersuchung auf Mikrosporidien

Wie in Kapitel 2.2 bereits erwähnt, können Maiszünsler, die vom Feld gesammelt wurden, mit Mikrosporidien befallen sein. Beim Maiszünsler handelt es sich hauptsächlich um die Art *Nosema pyrausta*. Da die Übertragung auch transovariell erfolgt, könnten die aus den

Lichtfallen entnommenen Eigelege befallen sein. Da die Sporen der Mikrosporidien durch eine widerstandsfähige Hülle aus Chitin auf eine Überdauerung außerhalb des Wirtsorganismus bestens ausgestattet sind, kann eine Übertragung auch zwischen den einzelnen Tieren in der Zucht erfolgen.

Untersuchungen verschiedener Bekämpfungsmethoden durch Kältebehandlung der Eigelege und Oberflächensterilisation mit Natriumhypochlorid (NaOCl) zeigten nicht den gewünschten Erfolg und führten zu einem Verlust an Eigelegen. Durch einen Befall der Laborzuchten würden erhebliche Probleme auftreten, da durch herabgesetzte Fitness und erniedrigte Fertilität der Zuchterfolg eingeschränkt wäre. Ebenso kann eine korrekte Durchführung der Toxizitätstests nicht gewährleistet sein, wenn die Mortalität in der Kontrolle durch Mikrosporidienbefall erhöht ist. Aus diesen Gründen wurde die Laborzucht in kontinuierlichen Abständen auf das Vorkommen von *Nosema* untersucht. Grundsätzlich erscheinen zwei Methoden für den Nachweis geeignet. So können Mikrosporidien in befallenem Insektengewebe durch Präparation des Gewebes und anschließende Mikroskopie erkannt werden. Dabei werden der Fettkörper, die Spinndrüsen, die Malpighischen Gefäße und die Darmwand mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops auf das Vorhandensein von Sporen untersucht. Diese finden sich hauptsächlich in den Spinndrüsen und den Malpighischen Gefäßen. Um die Mikrosporidien von Pilzsporen zu unterscheiden, kann zusätzlich eine Giemsa-Färbung erfolgen. Da sich die eindeutige Identifikation der Sporen im Gewebe als schwierig erwies, wurden Larven der einzelnen Standorte jährlich zur Untersuchung zu Frau Dr. Kleespies an die BBA Darmstadt geschickt. Dabei zeigte sich im Jahr 1999 eine erhöhte Infektionsrate der Larven vom Bodensee und Breisgau, die im Jahr 2000 deutlich zurückging. In den Jahren 2001 und 2002 waren keine Mikrosporidien in den Zuchten nachzuweisen.

Eine Alternative zum mikroskopischen Nachweis ist die Anwendung molekularbiologischer Methoden. Durch eine Isolation der Gesamt-DNA des Maiszünslers und anschließender PCR kann eine Basensequenz der rDNA von Mikrosporidien nachgewiesen werden.

Die Primersequenzen und genauen PCR –Bedingungen für die Detektion von *Nosema*-Arten wurden freundlicherweise von Dr. Charles Vossbrinck von der University of Illinois zur Verfügung gestellt. Die Isolierung der Maiszünsler-DNA wird im Einzelnen in Kapitel 3.4.4 erläutert. Es wurden 10 L5-Larven aus der Zucht (6 x Karlsruhe, 4 x Bodensee) eingesetzt. Zusätzlich wurden 10 Larven (Karlsruhe) für den histologischen Nachweis verwendet. Diese Larven wurden nach der Tötung mit Diethylether in zwei Teile halbiert, wobei mit der hinteren Hälfte in der BBA Darmstadt eine Untersuchung auf Mikrosporidienbefall unter dem Mikroskop erfolgte. Bei zwei dieser Proben wurde eine Mikrosporidiose eindeutig

nachgewiesen. Die DNA der anderen Larvenhälfte dieser beiden Proben mit Befund wurde als Positivkontrolle für die PCR eingesetzt, die Hälften der restlichen Larven ohne Befund dienten als Negativkontrolle. Die Nukleotidsequenzen der verwendeten Primer sind in Tab. 3.6 aufgelistet. Die genauen Bedingungen des PCR-Programms sind Tab. 3.7 zu entnehmen.

Tab. 3.6: Basensequenzen der Primer zum Nachweis von Mikrosporidien

Primer	Basensequenz
Nos18f	5'- GTT GAT TCT GCC TGA CGT- 3'
Nos440r	5'- TAC T(AT)C (CT)CA TAA CTG CCT CA- 3'
Nos1492r	5'- GGT TAC CTT GTT ACG ACT T- 3'

Der Primer Nos18f wird als „forward primer“ jeweils in Kombination mit einem der „reverse primer“ Nos440r (spezifisch für Gattung *Nosema*) oder Nos1492r (Universalprimer für Mikrosporidien) eingesetzt. Die Kombination Nos18f/Nos1492r sollte ein 1200 Nucleotid großes Amplifikationsprodukt bilden, das entsprechend andere Primerpaar ein deutlich kleineres, 500 bp langes PCR-Fragment (pers. Mitteilung C. Vossbrinck). Nähere Erläuterungen zur PCR-Methodik, sowie das Prinzip der Gelelektrophorese werden in den folgenden Kapiteln 3.4.1 (Prinzip der PCR) und 3.4.2 (Elektrophoretische Auftrennung) näher erläutert. Die verwendeten Materialien für sämtliche molekularbiologischen Untersuchungen finden sich im Anschluss an diese Kapitel.

Tab. 3.7: PCR Temperaturprogramm (NOSEMA):

<u>step</u>	<u>Dauer</u>	<u>Temperatur</u>
1	3'	94°C
2	45''	94°C
3	30''	45°C
4	1'30''	72°C
5	34 x step 2 – 4	
6	5'	72°C
7	3'	20°C

3.4 Genetische Diversitätsbestimmungen

Um die Maiszünsler verschiedener geographischer Regionen und unterschiedlicher Wirtspflanzen voneinander abzugrenzen und genetisch zu charakterisieren, wurden molekularbiologische DNA-Fingerprint-Analyseverfahren eingesetzt. Damit können Verwandtschaftsbeziehungen verschiedener Maiszünslerherkünfte untersucht werden, sowie die genetische Diversität innerhalb von Maiszünslerpopulationen erfasst werden. Vorhandene Polymorphismen lassen sich auch nachweisen, wenn die Basensequenz unbekannt ist.

Für die genetische Untersuchung der Maiszünsler-DNA wurden hier zwei Methoden angewandt, die in den folgenden Kapiteln näher erläutert werden.

3.4.1 Prinzip der PCR

Die Grundlage beider Methoden ist die Polymerasekettenreaktion, die als PCR (Polymerase Chain Reaction) bezeichnet wird. Diese Methode ist ein Verfahren zur selektiven Amplifikation von DNA oder RNA definierter Länge und definierter Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen. Sie basiert auf der enzymatischen Amplifikation eines ausgewählten DNA-Bereiches. Man nutzt hierzu die Eigenschaften von DNA-Polymerasen, die einen Einzelstrang zu einem Doppelstrang polymerisieren können, wenn ihnen ein kurzer, einzelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht. Diese Oligonucleotide müssen komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize (template) sein.

Unter geeigneten Bedingungen bilden sich Hybridmoleküle zwischen jeweils einem Strang der zu amplifizierenden DNA und den zu diesem Strang passenden Oligonucleotid aus. Der durch Anlagerung der Oligonucleotidprimer entstandene Bereich dient als Startpunkt für die Polymerase. Mit ihrer Hilfe werden in Gegenwart von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize neue DNA-Stränge synthetisiert, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist. Für eine Wiederholung der Synthese muss die jetzt doppelsträngige DNA erneut durch Hitze aufgeschmolzen werden. Die Primer werden bei fallender Temperatur wieder an die DNA gebunden und der Zyklus beginnt von vorne. Bei Wiederholung der Reaktionsfolge aus DNA-Denaturierung, Anlagerung der Primer („Annealing“) und DNA-Synthese kommt es nach jedem Reaktionsschritt zu einer Verdopplung der DNA und damit zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung der primerflankierten Sequenz (Newton & Graham 1994). Die PCR-Produkte können zur weiteren Untersuchung mit Hilfe von Agarose- oder Polyacrylamidgelen nach ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt werden und durch verschiedene Methoden im Gel sichtbar gemacht werden.

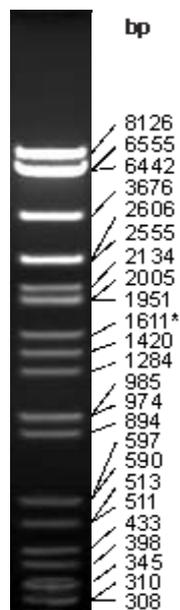
3.4.2 Elektrophoretische Auftrennung

Die Elektrophorese ist ein biochemisches Trennverfahren, bei dem die Wanderung von geladenen Molekülen in einem elektrischen Feld zu deren Trennung ausgenutzt wird. Wie viele andere Biomoleküle trägt auch die DNA eine elektrische Ladung. Aufgrund der negativen Ladung der DNA wandert sie in einem elektrischen Feld in Richtung des positiven Pols. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Moleküls hängt von zwei Eigenschaften ab: von seiner elektrischen Ladung und von seiner Form. Da die meisten DNA-Moleküle im Verhältnis zu ihrer Masse annähernd die gleiche Ladung besitzen, reicht eine einfache Elektrophorese zur Trennung von Fragmenten unterschiedlicher Größe nicht aus. Die Elektrophorese zur Trennung von DNA wird in einer elektrisch neutralen, festen Gelmatrix aus Agarose oder Polyacrylamid durchgeführt. Das Gel wirkt aufgrund seiner Porenstruktur wie ein Molekularsieb, das die Wanderung von Makromolekülen verlangsamt, während niedermolekulare Substanzen ungehindert durch die Matrix wandern können. Je kleiner ein DNA-Fragment ist, desto schneller kann es sich durch das Gel bewegen.

3.4.3 Auftrennung mit Hilfe von Agarosegelen

Zur Analyse selektiver Amplifikationsprodukte, wie etwa beim Nachweis von transgenem Mais oder bei der Untersuchung auf Mikrosporidien reicht eine Auftrennung in einem Agarosegel (1% -1,5% Agarose) aus. Das Gleiche gilt für die DNA-Fragmente der RAPD-Analyse. Da hier mehr als eine Bande erwartet werden und auch kleinere DNA-Produkte auftauchen können, werden 2%ige Agarosegele verwendet, um eine bessere Auftrennung einzelner Banden zu erzielen.

Eine einfache Methode, um das Ergebnis einer Gelelektrophorese sichtbar zu machen, ist die Färbung des Gels mit einer Verbindung, die DNA anfärbt. Diese Methode wurde bei den Agarosegelen angewandt. Dazu wurde in diesem Fall Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylphenantridiniumbromid) eingesetzt, welches zu den sequenzunspezifisch DNA-bindenden Substanzen zählt, da es sich zwischen einzelne Basenpaare eines doppelsträngigen DNA-Moleküls einlagern kann. Wird das Gel nach der Elektrophorese mit UV-Licht bestrahlt, so fluoresziert die DNA im sichtbaren Licht orange (590 nm).



Bei allen hier beschriebenen Reaktionen wurde das Ethidiumbromid vor der Elektrophorese in die noch flüssige, auf 60°C abgekühlte Agaroselösung gegeben (0,15 µl EtBr /ml Agarose). Die Agarose wurde zuvor in 1 x TAE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle aufgekocht. Jeweils 22 µl des PCR-Ansatzes wurden auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde an eine Spannung von 110 Volt angeschlossen und die DNA in TAE-Puffer getrennt. Die Elektrophoresedauer variierte je nach Größe und Anzahl der erwarteten Amplifikationsprodukte zwischen 1 h und 3 h. Um ein Überhitzen des Gels während der Elektrophorese zu verhindern fand die PCR in einem klimatisierten Raum bei etwa 14°C statt.

Als Längenstandard diente ein Größen-Marker, bei dem λ -DNA mit dem Restriktionsenzym Eco 47 I geschnitten wurde. In Abb. 3.4 sind die daraus resultierenden Markerbanden dargestellt. Zur Detektion der Lauffront und um das Auftragen der Proben auf das Gel zu vereinfachen, wurde ein „bluemarker“ in einer 1:10 Verdünnung zu den Proben gegeben.

Abb. 3.4.: λ -DNA Eco47 I-Marker

Durch den blauen Farbstoff und das zugesetzte Glycerin wurde das Auftragen der Proben erleichtert und die Möglichkeit gegeben den Lauf zu kontrollieren. Von dem entstandenen Produkt wurden jeweils 20 µl auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde nach dem Lauf mit einer Polaroidkamera unter Verwendung eines Orangefilters im UV-Licht fotografiert.

Tab. 3.8: Verwendete Chemikalien und Geräte für die PCR und Gelelektrophorese

I. PCR:

- Thermocycler PTC 100 MJ Research
- Kühlzentrifuge 5417 R Eppendorf
- 0,2 ml Reaktionsgefäße / PCR Strips Roche Diagnostics
- Primer MWG-Biotech
- Wasser, Molecular Biology Grade Eppendorf
- PCR-Puffer: Eurogentec, Belgien
 - 750 mM Tris/HCl (pH 9,0)
 - 200 mM (NH₄)₂SO₄
 - 0,1 % (w/v) Tween
- MgCl₂ (50 mM)
- dNTP Set bestehend aus:
- dATP, dCTP, dGTP und dTTP je 5 µM MBI Fermentas
- Taq-Polymerase SilverStar™ Eurogentec
 - 5 U/µl in Lösungspuffer:
 - 100 mM NaCl • 0,1 % Tween-20
 - 0,1 mM EDTA • 50 % (v/v) Glycerin
 - 2 mM DTT • 20 mM Tris-HCl (pH 7,5)

II. Agarose-Gelelektrophorese:

- 50 x TAE–Laufpuffer: Eppendorf
 - 0,05 M EDTA, pH 8,3
 - 2 M Tris-Acetat
- Ethidiumbromid 1 % (10 mg/ml) Fluka
 - C₂₁H₂₀BrN₃
- Agarose: Molecular Biology Grade Eurogentec
- Beladungslösung (Farbstoff „bluemarker“): MBI Fermentas

- | | |
|---|---------------|
| - Längenstandard: Lambda DNA / Eco 47 I | MBI Fermentas |
| • 0,25 % (w/v) Bromphenolblau | |
| • 50 % (v/v) Glycerin | |
| - Power-Supply: Power pac 300/3000 | Biorad |
| - UV-Illuminator 302 nm | Bachofer |
| - Fotokamera MP4 mit Orangefilter | Polaroid |
| - Schwarzweiß-Sofort Packfilm Typ 667 | Polaroid |
| - Mikrowelle | Panasonic |

3.4.4 DNA-Isolation

Die bei – 20°C in einzelnen 2 ml Reaktionsgefäßen gelagerten adulten Maiszünsler wurden in ein Dewargefäß mit flüssigem Stickstoff überführt. Um die DNA-Präparation zu erleichtern, wurden den Faltern mit sterilem Skalpell Flügel und Kopf abgetrennt und der Insektenkörper gründlich in flüssigem Stickstoff zerkleinert. Dazu wurden speziell angefertigte Pistille verwendet, mit deren Hilfe die Proben im Reaktionsgefäß gemörsert werden konnten.

Für beide in dieser Arbeit verwendeten Methoden ist die Grundvoraussetzung eine saubere DNA ohne störende Inhaltsstoffe (Reineke et al. 1998). Daher wurde nach einigen Vorversuchen mit verschiedenen DNA-Isolationsmethoden das DNeasy™ Tissue Kit der Firma Qiagen verwendet. Diese Methode der DNA-Isolation basiert auf einer Silicagel-Membran Technologie und erreicht damit eine hohe Reinheit der gewonnenen DNA, die eine Grundvoraussetzung für den Einsatz in der AFLP-Methode ist. Außerdem konnte auf den Zusatz giftiger Stoffe wie Phenol oder Chloroform verzichtet werden. Nach einer Behandlung der DNA mit Proteinase bei der störende Proteine, wie DNAsen inaktiviert wurden und der Zugabe von RNase, die selektiv nur RNA spaltet, wurde die Probe auf eine Minisäule gegeben und an die Silicagel-Membran gebunden. Verunreinigungen und PCR-Inhibitoren wurden in weiteren Schritten mit Hilfe von Waschpuffern (Puffer AW) herausgewaschen und die DNA wurde abschließend mit Hilfe eines Nidrigsalz-Puffers (Puffer AE) von der Säule eluiert und konnte sofort eingesetzt werden.

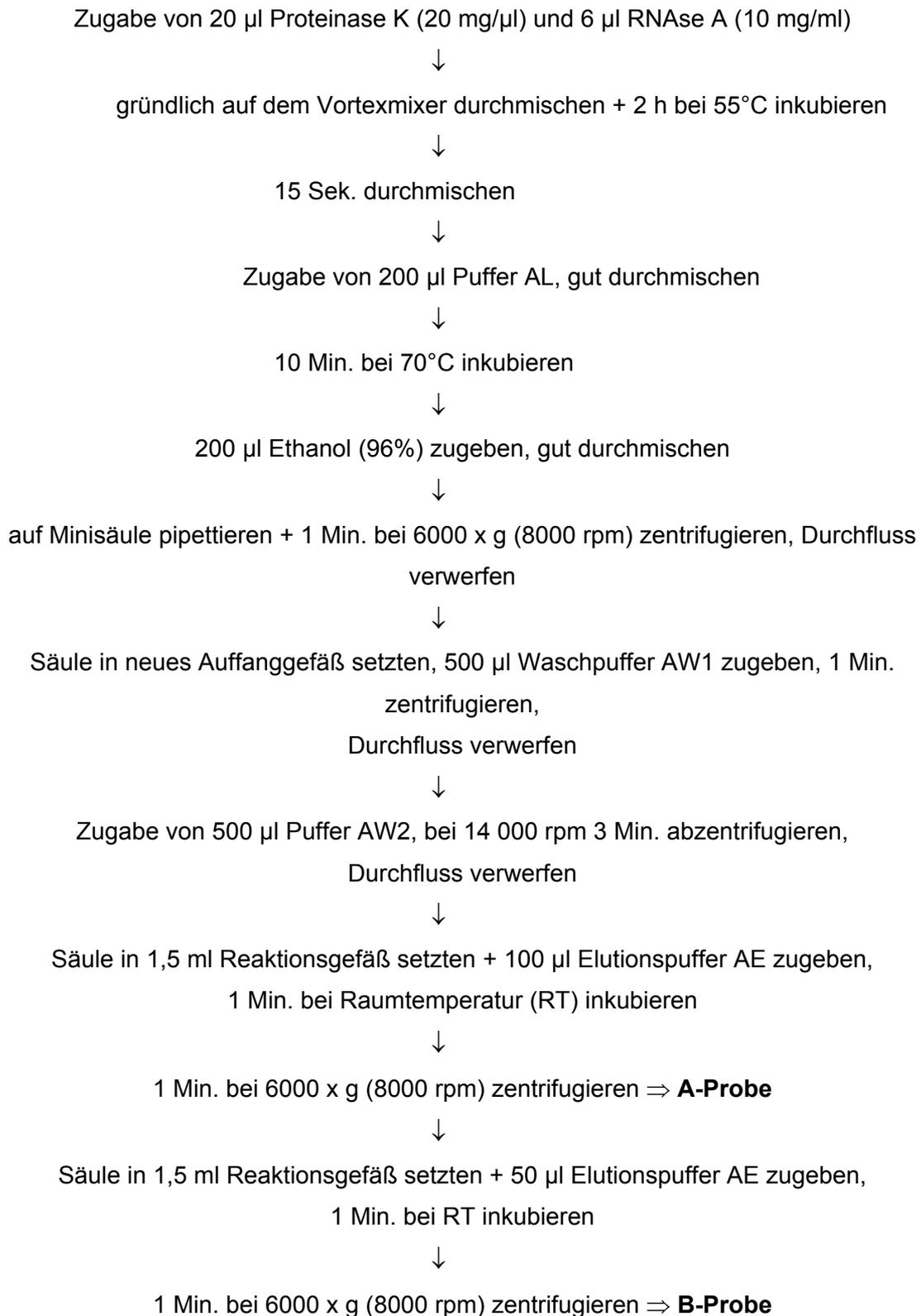
Im folgenden Schema sind die einzelnen Schritte der DNA-Isolation aufgeführt:

etwa 20-30 mg des Insektenkörpers in flüssigem N₂ gründlich mörsern



Zugabe von 180 µl Lysispuffer ATL





Die so gewonnene DNA wurde zur weiteren Verarbeitung bei 4°C im Kühlschrank gelagert oder für einen längeren Zeitraum bei – 20°C im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Die A-Proben

der einzelnen Individuen wurden für die AFLP-Analyse verwendet, die B-Proben der selben Tiere für die RAPD-Untersuchungen eingesetzt oder als Rückstellprobe bei -50°C gelagert.

Die Menge der erhaltenen DNA wurde durch Konzentrationsbestimmung im Agarosegel abgeschätzt. Dazu wurde ein Mengenstandard („Smart Ladder“) eingesetzt, der DNA in definierter Konzentration und Länge enthält. Die verschiedenen Bandengrößen und die darin enthaltene DNA-Menge sind Abb. 3.5 zu entnehmen. Der DNA-Gehalt der einzelnen Proben kann durch einen Vergleich der Markerbanden abgeschätzt werden. Bei einem Auftragsvolumen von $5\ \mu\text{l}$ lässt sich eine bestimmte Bande der entsprechenden Leuchtintensität einer äquivalenten DNA-Menge zuordnen.

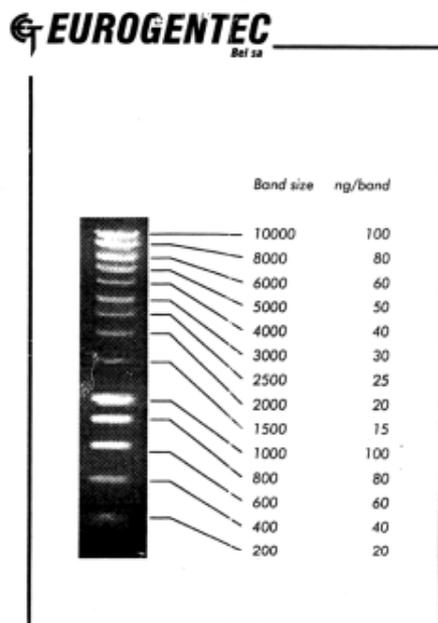


Abb. 3.5: Bandengröße und enthaltene DNA-Konzentration des Mengenstandards „smart-ladder“ zur Abschätzung von DNA-Konzentrationen im Agarosegel.

Zusätzlich können Aussagen über die Qualität und Reinheit der isolierten DNA mit Hilfe der Gelelektrophorese gemacht werden. Verunreinigte oder degradierte DNA bildet Schlieren auf dem Gel. Die genomische Maiszünsler-DNA sollte als distinkte Bande erkennbar sein. Für die AFLP-Methode ist eine hohe Qualität der isolierten DNA nötig. Das Vorhandensein von Inhibitoren kann nachfolgende Reaktionen wie die PCR oder die Restriktion der DNA negativ beeinflussen (Reineke et al. 1998).

3.4.5 AFLP

Die AFLP-Methode (**A**mplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphism) basiert auf der selektiven Amplifizierung von DNA-Fragmenten mit Hilfe der PCR (Vos et al. 1995). Sie gehört wie auch die RAPD-PCR zu den DNA Fingerprint Techniken. Dabei werden Polymorphismen

detektiert, die zum einen als molekulare Marker verwendet werden oder auch zur Bestimmung von Verwandtschaftsbeziehungen eingesetzt werden können. Diese relativ neue Anwendung der PCR verbindet die Reproduzierbarkeit und Stabilität der RFLP-Analyse (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism) mit der Variabilität und Effektivität der RAPD-Untersuchung. Inzwischen wird diese Methode vielfach bei verschiedenen Organismen eingesetzt und findet Verwendung sowohl bei pflanzlichem wie auch bei tierischen oder Bakteriengenomen (Thome et al. 1996; Russel et al. 1997; Zhu et al. 1998).

Die AFLP Methode kann in verschiedene Arbeitsschritte eingeteilt werden:

Restriktion der isolierten DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen

Ligation der Adaptoren

Präamplifikation der Fragmente (Primer mit einer zusätzlichen Base)

Selektive Amplifikation (Primer mit drei zusätzlichen Basen)

Auftrennung und Detektion der Amplifikationsbanden

In einem ersten Schritt wurde die genomische DNA mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut. Dabei wurde ein häufig schneidendes und ein selten schneidendes Enzym verwendet (Vos & Kuiper 1998). In dieser Arbeit wurde Mse I (Tru I) als häufig schneidendes Restriktionsenzym eingesetzt. Da es nur 4 Basen als Erkennungsstelle benötigt, erzeugt Mse I viele kurze DNA-Fragmente. Es verwendet als Schnittstelle die 4er Sequenz 5'-TTAA. Da eukaryotische Genome AT-reich sind, schneidet Mse im Insektengenom besonders häufig. Die optimale Temperatur für einen Verdau mit Mse I liegt bei 65°C. Um die Anzahl der Fragmente einzugrenzen, wurde zusätzlich das seltener schneidende Enzym Eco RI eingesetzt, das sechs Basen mit der Sequenz 5'-GAATTC für die Restriktion erkennt (Vos et al. 1995). Außerdem erfolgte der Doppelverdau bei einer Temperatur von 37°C, was zwar dem Optimum für Eco RI entspricht, gleichzeitig aber dazu führte das Mse seltener schneiden konnte. Die durch den Verdau entstandenen DNA-Fragmente bildeten am 5'-Ende Überhänge („sticky ends“) aus zwei (Mse I) bzw. vier (Eco RI) Basen von denen die Sequenz bekannt war.

An die Enden dieser Restriktionsfragmente wurden in einem weiteren Schritt spezifische Adaptoren ligiert. Die Adaptoren sind 16 Basenpaare lange DNA-Stücke, die ein überhängendes Ende aufweisen, das komplementär zum Ende der jeweiligen Restriktionsschnittstelle passte. Durch diesen **Ligationsschritt** besitzen die Fragmente Enden bekannter Sequenz, jeweils ein Eco-Adaptor und ein Mse-Adaptor. Um die Anzahl dieser Fragmente in nachfolgenden PCR-Reaktionen zu vervielfältigen, wurden zu den Adaptoren passende Primer eingesetzt. Die Sequenz dieser Adaptoren an der jeweiligen

Restriktionsschnittstelle diene entsprechend als Bindungsstelle für die AFLP-Primer. Die Primer unterschieden sich am 3'-Ende hinsichtlich der Anzahl selektiver Nukleotide.

In einem ersten PCR-Schritt, der **Präamplifikation**, wurden je zwei +1-Primer (einer für die Eco-Adaptoren, der andere für die Mse-Adaptoren) eingesetzt, die eine zusätzlichen Base (A oder C) besitzen und somit nur ein Viertel aller vorhandenen Fragmente amplifizieren sollten.

In einer zweiten PCR, der **spezifischen Amplifikation**, wurden jeweils zwei +3-Primer eingesetzt, die 3 zusätzliche Nukleotide aufwiesen. Über die einzelnen Basen konnte die Komplexität des Bandenmusters variiert werden. Um eine Detektion der entstandenen Banden im Polyacrylamidgel zu ermöglichen, wurde der eingesetzte +3-Eco-Primer mit IRD 700 fluoreszenzmarkiert und konnte mit dem entsprechenden Gerät bei einer Wellenlänge von 700 nm detektiert werden. Um die Anzahl der detektierbaren Banden im Gel zu minimieren, wurde nur ein Primer markiert, so dass die Fragmente mit einer EcoRI-Sequenz sichtbare Banden ergaben. Durch die Markierung nur eines Stranges wurde außerdem das Auftreten von Doppelbanden verhindert.

Die **Auftrennung der Amplifikationsprodukte** erfolgte mit Hilfe der Gelelektrophorese in einem denaturierenden Polyacrylamidgel. Ein automatischer Sequenzierer ermöglichte die Detektion der markierten Banden.

Im Gegensatz zu Agarosegelen ist die Trennschärfe bei Polyacrylamidgelen deutlich höher. Hier können sogar Fragmente voneinander getrennt werden, die sich in ihrer Länge nur um ein Nucleotid unterscheiden. Bei der Vielzahl an Banden, die durch die AFLP-Methode erwartet werden und ihrer durch die Restriktion entstandenen kleinen Fragmente, kann ein Agarosegel die benötigte Auftrennung der einzelnen Fragmente nicht erreichen (Ibelgauffs 1990). Für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wird das Gel in einer radikalischen Polymerisation aus Acrylamid und N',N'-Methylenbisacrylamid in einer gepufferten Lösung hergestellt. Die Acrylamid-Monomere werden dabei zu einem dreidimensionalen Netzwerk verbunden. Der Beginn der Polymerisation wird durch N'N'N'N-Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator und Ammoniumpersulfat (APS) initiiert. (Voet & Voet 1992). Durch die Zugabe von TEMED wird die Bildung freier Radikale aus dem Persulfat katalysiert, wodurch die radikalische Kettenreaktion des Acrylamid gestartet wird. Die physikalischen Eigenschaften des Gels und seine Porengröße werden durch den Anteil an Polyacrylamid im Gel und seinem Vernetzungsgrad bestimmt. Um die hohe Trennschärfe zu gewährleisten werden sehr dünne Polyacrylamidgele eingesetzt (0,3 mm). Die Gele enthalten Harnstoff, der die DNA denaturiert. Zusätzlich wird an das Gel eine sehr hohe Spannung angelegt

(1200 V) und das Gel vor Beginn des Laufs auf 45°C vorgewärmt, um sicherzustellen, dass sich die Einzelstränge nicht wieder renaturieren.

Durchführung der AFLP

Pro Standort (geographische Region) und Wirtspflanze (Mais oder Beifuss) wurden zwanzig Tiere analysiert. Zusätzlich wurden Maiszünsler aus Spanien in die Untersuchung eingeschlossen. Die Tiere stammten aus der Laborzucht von Dr. Felix Orthege (Madrid) und wurden im Jahr 2000 in repräsentativen geographischen Gebieten im Süden (Andalucia) und Südwesten (Badajoz) Spaniens als L5-Larven gesammelt. Außerdem wurden 10 adulte Kohlschaben (*Plutella xylostella* L.) aus der Stammzucht der BBA in Braunschweig als Vergleich („outgroup“) mit in die AFLP-Analyse aufgenommen.

Bis auf Maiszünsler der Standorte Halle und Oderbruch, die uns vom Projektpartner BBA Kleinmachnow als gefrorene L5-Larven zugesandt wurden, handelte es sich bei den untersuchten Tieren um adulte Falter, jeweils 10 Weibchen und 10 Männchen, die mit Hilfe phänotypischer geschlechtsspezifischer Merkmale unterschieden wurden. Grundsätzlich sollten für Untersuchungen zu Populationsstrukturen und zur genetischen Diversität, wie sie hier mit Hilfe der AFLPs durchgeführt wurden, nicht weniger als 20 Individuen verwendet werden, um genetischen Distanzen statistisch sicher bestimmen zu können (Baker 2000). Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden adulte Tiere bevorzugt, da sie sich vor dem Einfrieren noch vermehren können und so ihr genetisches Material nicht für die Zucht verloren geht. Außerdem nehmen adulte Tiere im Gegensatz zu Larven kaum noch Nahrung auf, so dass weniger Fremd-DNA (etwa vom Nährmedium) mit isoliert wird.

Tab 3.9: Ursprung der für die AFLPs verwendeten DNA

Herkunft (Standort)	Abkürzung	Generation	Entwicklungsstadium
Bodensee	B	1 + 2	Imagines
Bonn (unteres Rheintal) Beifusspopulation	N	8	Imagines
Bonn (unteres Rheintal) Maispopulation	E	1	Imagines
Freiburg (oberes Rheintal)	F	6	Imagines
Halle	H	Freiland	Larvenstadium 5
Karlsruhe (mittleres Rheintal)	K	8	Imagines
Oderbruch	O	Freiland	Larvenstadium 5
Spanien	S	Laborzucht (8. Gen.)	Imagines
<i>P. xylostella</i> Laborzucht (BBA Braunschweig)	P	Laborzucht	Imagines

Restriktion

Die isolierte genomische DNA (siehe Tab. 3.9) wurde gleichzeitig in einem Doppelverdau mit den beiden Restriktionsenzymen Mse I (Trul) und Eco RI geschnitten. Für eine optimale Restriktion sollte die eingesetzte DNA-Menge nicht unter 100 ng liegen (Vos et al. 1995), bei einer DNA-Konzentration über 0,5 µg kann ein unvollständiger Verdau der DNA erfolgen.

Um die richtige Menge einzusetzender DNA zu bestimmen, wurden Testreihen mit mehreren Restriktionsansätzen unterschiedliche DNA-Konzentration angesetzt. In Vorversuchen wurden durch verschiedene Ansätze mit variierenden Enzymkonzentrationen, unterschiedlicher Inkubationsdauer und Temperatur die Bedingungen für die Restriktion von Maiszünsler-DNA optimiert.

Die einzelnen Bestandteile des Restriktionsansatzes in der Pipettierreihenfolge, sowie ihre Endkonzentrationen sind in Tab. 3.10 aufgelistet. Um einen partiellen Verdau der DNA zu verhindern, wurden die beiden Restriktionsenzyme im Überschuss dazugegeben.

Tab. 3.10: Auflistung der einzelnen Komponenten der Restriktion

Komponente	Volumen pro Probe	Endkonzentration
H ₂ O	add. 50 µl	
Puffer Y ⁺ /Tango™	5 µl	1 x
Mse I (10 U/µl)	0,3 µl	3 units
Eco RI (10 U/µl)	0,5 µl	5 units
DNA	<u>40 µl</u>	0,3 –0,4 µg
	50 µl Gesamtvolumen	

Die Reaktion erfolgte in 1,5 ml Reaktionsgefäßen. Die DNA wurde jeweils vorgelegt, die einzelnen Komponenten wurden in der oben angegebenen Reihenfolge zusammenpipettiert (mastermix) und zur DNA gegeben, gut durchmischt und kurz abzentrifugiert. Der Restriktionsansatz wurde bei 37°C im Thermoblock für 2 h inkubiert. Um den Verdau zu beenden, wurden die Proben danach bei –20°C eingefroren.

Ligation

Durch die Ligation der Adaptoren an die Schnittstellen der beiden Enzyme wurden Anlagerungsstellen bekannter Sequenz für die Primer der nachfolgenden PCR-Schritte gebildet. Eine Wiederherstellung der Restriktionsschnittstellen wurde durch ligierte Adaptoren vermieden. Die genauen Basensequenzen der einzelnen Adaptoren sind in Tab. 3.11 aufgelistet. Die einzelnen synthetisch hergestellten Oligonukleotide wurden in äquimolaren Mengen zusammenpipettiert, um doppelsträngige Adaptoren zu bilden.

Tab. 3.11: Basensequenzen der Adaptoren

Bezeichnung	Sequenz	doppelsträngiger Adaptor
A Eco a	5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'	5'-CTCGTAGACTGCGTACC
A Eco b	5'-AAT TGG TAC GCA GTC-3'	CTGACGCATGGTTAA-5'
A Mse a	5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3'	5'-GACGATGAGTCCTGAG
A Mse b	5'-TAC TCA GGA CTC AT-3'	TACTCAGGACTCAT-5'

Da durch das häufiger schneidende Mse-Enzym auch ein größerer Anteil an Mse-Fragmenten zu erwarten war, wurde eine höhere Konzentration an MseI-Adaptoren zur restringierten DNA gegeben. Jeweils 10 µl dieses Ansatzes (mastermix) wurden zu den 50 µl des Restriktionsansatzes zugegeben, durchmischt und abzentrifugiert. Die einzelnen Bestandteile des Ligationsansatzes sind Tab. 3.12 zu entnehmen. Die Proben wurden entweder 3 h bei 37°C im Thermoblock inkubiert oder über Nacht im Thermokonstantraum bei 14°C gelagert. Nach Beendigung der Ligation konnte die DNA sofort für die folgende Präamplifikation weiter verwendet werden oder wurde bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

Zur Kontrolle der Restriktion wurden 10 µl des Restriktions/Ligationsansatzes (RL) mit 8 µl Längenstandard (λ DNA/ Eco 47 I) auf ein Agarosegel (1%) aufgetragen und für etwa 90 Minuten bei 110 V mit Hilfe der Gelelektrophorese (siehe Kap. 3.4.3) aufgetrennt. Zusätzlich wurde jeweils eine Blindprobe (Restriktionsansatz mit Wasser an Stelle von DNA) mit auf das Gel aufgetragen.

Tab. 3.12: Übersicht der Bestandteile für die Ligation

Ligationskomponente	Volumen pro Probe	Endkonzentration
H ₂ O	6 µl	
Ligasepuffer (10 x)	1 µl	1 x
EcoRI-Adaptor (5 pmol/µl)	1 µl	5 pmol/µl
MseI-Adaptor (50 pmol/µl)	1 µl	50 pmol/µl
DNA-Ligase (1U/µl)	<u>1 µl</u>	1 U
	10 µl	
	Gesamtvolumen	

Präamplifikation

Da die Anzahl der vorhandenen DNA-Fragmente für eine Auswertung zu groß war, wurden bei der Präamplifikation Primer mit je einer zusätzlichen Base eingesetzt. Die genauen Basensequenzen dieser +1-Primer sind Tab. 3.13 zu entnehmen.

Tab. 3.13: Basensequenzen der Primer für die Präamplifikation

Primer +1	Primerbasensequenz
E + A	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'
M + A	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AA-3'
M + C	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC-3'

Vor Beginn der Präamplifikation wurde die RL-DNA (DNA nach Restriktion und Ligation) 1:10 verdünnt, da ihre Konzentration für den Einsatz in der PCR zu hoch war. Dafür wurden 10 µl RL-DNA mit 90 µl sterilem hochreinem Wasser verdünnt.

Zu Beginn der PCR wurde jeweils 1,5 µl der verdünnten RL-DNA in 0,2 ml PCR-strips vorgelegt. Der PCR mastermix wurde wie in Tab. 3.14 aufgelistet, zusammenpipettiert, kurz durchmischt und jeweils 48,5 µl zur vorgelegten DNA gegeben. Die strips wurden kurz abzentrifugiert. Um systemische Kontaminationen durch Verunreinigung des Pipettenkolbens mit DNA-haltigen Aerosolen zu vermeiden, wurden bei allen Arbeitsschritten Pipettenspitzen mit Filtern verwendet.

Tab. 3.14: Bestandteile der Präamplifikation

PCR-Komponenten	Volumen pro Probe	Endkonzentration
H ₂ O	add. 50 µl	
10 x PCR Reaktionspuffer	5 µl	1 x
dNTPs (2 mM)	5 µl	0,2 mM
MgCl ₂ (50 mM)	2,5 µl	2,5 mM
E + 1 Primer (50 ng/µl)	1,5 µl	1,5 ng/µl
M + 1 Primer (50 ng/µl)	1,5 µl	1,5 ng/µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,5 µl	2,5 U (0,05 U/µl)
RL-DNA (1:10)	<u>1,5 µl</u>	
	50 µl	
	Gesamtvolumen	

Die PCR-Reaktion lief mit Hilfe des in Tab. 3.15 beschriebenen Temperaturprogramms ab.

Tab. 3.15: PCR-Bedingungen der Präamplifikation
(Temperaturprogramm Nr. 3: PRÄAMPLIFIKATION)

<u>step</u>	<u>Dauer</u>	<u>Temperatur</u>	
1	3'	94°C	Denaturierung
2	30''	94°C	Denaturierung
3	60''	56°C	Primerhybridisierung (Annealing)
4	1'	72°C	Synthese
5	19 x step 2 – 4		
6	5'	72°C	Auffüllsynthese
7	∞	4°C	Kühlung

Die Gesamtdauer des Programms betrug 1 h 17 Min. Da bei dem verwendeten Thermocycler ein beheizbarer Deckel (Deckeltemperatur 100°C) vorhanden war, erübrigte sich eine zusätzliche Überschichtung der Proben mit Öl.

Nach Ablauf des Programms wurde die erfolgte Amplifikation mit jeweils 10 µl auf einem Agarosegel (1%) bei 110 V (90 Minuten) kontrolliert.

Selektive Amplifikation

Um die Anzahl der Amplifikationsfragmente zu verringern und einzelne Fragmente anzureichern, wurde eine zweite PCR-Reaktion durchgeführt. Dabei wurden diesmal Primer eingesetzt, die jeweils drei zusätzliche zufällig ausgewählte Basen besitzen (+3 Primer). Tabelle 3.16 gibt eine Übersicht über die verwendeten +3 Primer.

Für sämtliche untersuchten Maiszünsler der jeweiligen Standorte wurden in der selektiven Amplifikation neun verschiedene Mse-Primer verwendet, die mit immer demselben Eco-Primer gepaart wurden. Aus Kostengründen wurden nur unterschiedliche nichtmarkierte Primer ausgewählt. Der Mse-Primer lag jeweils im Überschuss vor.

Tab. 3.16: Verwendete +3 Primer für die AFLP-Amplifikation (* IRD 700 markiert)

Primer	Basensequenz	GC-Gehalt in %
E-AGG*	5'- GAC TGC GTA CCA ATT CAG G -3'	52,6
M-ACT	5'- GAT GAG TCC TGA GTA AAC T -3'	42,1
M-AGA	5'- GAT GAG TCC TGA GTA AAG A -3'	42,1
M-AGT	5'- GAT GAG TCC TGA GTA AAG T -3'	42,1
M-ATA	5'- GAT GAG TCC TGA GTA AAT A -3'	36,8
M-CAT	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACA T -3'	42,1
M-CCA	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACC A -3'	47,4
M-CTA	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACT A -3'	42,1
M-CTG	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACT G -3'	47,4
M-CTT	5'- GAT GAG TCC TGA GTA ACT T -3'	42,1

Da die DNA nach der Präamplifikation zu hoch konzentriert vorlag, um sie in der selektiven Amplifikation einzusetzen, wurden die Proben vor der zweiten PCR-Reaktion 1:20 verdünnt (190 µl hochreines steriles Wasser und 10 µl DNA der Präamplifikation). Die einzelnen Bestandteile der selektiven Amplifikation und ihre Konzentrationen sind Tabelle 3.17 zu entnehmen.

Tab. 3.17: PCR-Komponenten der selektiven +3 - Amplifikation

PCR-Komponente	Volumen pro Probe (Mastermix)	Endkonzentration
H ₂ O	add. 10 µl	
PCR-Reaktionspuffer (10 x)	1 µl	1 x
dNTPs (2mM)	1 µl	0,2 mM
MgCl ₂ (50 mM)	0,5 µl	2,5 mM
markierter E+3 Primer (10 ng/µl)	0,25 µl	0,25 ng/µl
M+3 Primer (50 ng/µl)	0,3 µl	1,5 ng/µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,04 µl	0,2 U (0,02 U/µl)
DNA (1:20)	<u>2,5 µl</u>	
Gesamtvolumen 10 µl		

Jeweils 2,5 µl der verdünnten DNA aus der Präamplifikation wurden als template vorgelegt und 7,5 µl des Mastermix zugegeben. Die selektive +3 Amplifikation wurde mit dem in Tab. 3.18 aufgelisteten PCR-Programm durchgeführt.

Tab. 3.18: PCR-Bedingungen der zweiten AFLP-Amplifikation (Temperaturprogramm Nr. 4: AFLP)

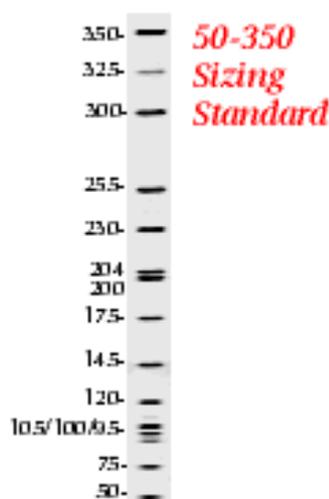
step	Dauer	Temperatur	Vorgang
1	3'	94°C	Denaturierung
2	30''	94°C	Denaturierung
3	30''	65°C	Primerhybridisierung (Annealing)
4	1'	72°C	Synthese
5	30''	94°C	Denaturierung
6	30''	65°C	Annealing
7	1'	72°C	Synthese
8	10 x step 5 - 7 Temperatur-Erniedrigung (Increment) von 0,7°C		
9	30''	94°C	Denaturierung
10	30''	58°C	Annealing
11	1'	72°C	Synthese
12	23 x step 9 – 11		
13	5'	72°C	Auffüllsynthese
14	∞	4°C	Kühlung

Um eine optimale Primerselektivität zu garantieren, wurde zu Beginn der PCR eine höhere Temperatur für die Anlagerung der Primer gewählt. Diese Annealingtemperatur wurde in den folgenden Schritten in Stufen von 0,7°C durch ein programmiertes Temperatur-Increment von 65°C auf 58°C herabgesetzt. Durch die niedrigere Annealingtemperatur konnte eine bessere Hybridisierung der Primer gewährleistet werden. Das Programm hatte eine Gesamtdauer von 1 h 55 Min. bei einer Heizdeckeltemperatur von 100°C.

Auftrennung und Detektion der Amplifikationsprodukte

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte durch die Verwendung denaturierender Polyacrylamidgele.

Als Längenstandard wurde ein Größenmarker eingesetzt, der wie der E +3 Primer ebenfalls infrarot markiert war (IRD 700 dye) und der 15 Banden im Abstand von 50–350 Basenpaaren



aufwies. Die genauen Bandengrößen des Markers sind in Abbildung 3.6 dargestellt. Der Längenstandard wurde in die erste und letzte Geltasche, also jeweils links und rechts der Proben, aufgetragen. Jeweils 5 µl der Proben wurden vor dem Beladen des Gels mit 3,5 µl Beladungspuffer vermischt. Die rote Farbe dieses Puffers, bestehend aus Fuchsinrot, diente der Sichtbarmachung der Proben beim Auftragen auf das Gel. Zusätzlich enthielt der Puffer Formamid, durch das die DNA denaturiert wurde, also einzelsträngig vorlag.

Abb. 3.6: Einzelne Bandengrößen in Basenpaaren des Längenstandards zur Größenabschätzung der DNA-Fragmente im Gel

Zur Bildung der Geltaschen wurde nach dem Gießen des Gels ein Kamm mit spitz zulaufenden Enden (sharktooth) für 64 Taschen eingesetzt. Es wurden 25 cm lange Gele mit einer Dicke von 0,25 mm und einem 8% igen Anteil an Acrylamid verwendet.

Im folgenden Schema soll die Vorgehensweise bei der Gelherstellung verdeutlicht werden:

gründliche Reinigung der beiden Glasplatten mit destilliertem Wasser zur Entfernung von

Gelresten



Polieren der Platten mit 96 % Ethanol



Zusammenbau der Glasplatten mit Abstandshaltern (0,3 mm)



Ansetzen der 8 % igen Gellösung:

160 ml Acrylamidlösung (Long Ranger), 120 ml 10 x TBE-Puffer, 420 g Harnstoff, 50 ml

Formamid



fertige Lösung 5 min. im Ultraschallbad entlüften



25 ml der Gellösung + 25 µl TEMED + 175 µl APS zusammenpipettieren, mischen



mit Glasspritze durch Sterilfilter zwischen die Glasplatten spritzen



Entfernen möglicher Luftblasen + Einschieben des Abstandshalters für den Gelkamm



1 h Auspolymerisieren des Gels



Befüllen der beiden Puffertanks mit 1 x TBE-Puffer



Reinigung der Geltaschen (Entfernen von Gelresten) + Ausspülen von Harnstoff mit Puffer



Starten des Vorlaufs zur Laserausrichtung (prerun)



nach 20 Min. Auftragung von jeweils 1 µl der Proben



Auftragen von je 0,7 µl Längenstandard (Größenmarker) neben den Proben



Start des Gellaufs (Laufzeit 5 h)

Die fluoreszenzmarkierten Banden konnten mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes (LI-COR 4200 2L) detektiert werden. Die Scangeschwindigkeit wurde auf die langsamste Stufe herabgesetzt, um eine möglichst hohe Empfindlichkeit in der Detektion zu erreichen. Zur Steuerung des Gellaufs wurde das Computerprogramm E-Seq verwendet. Mit dessen Hilfe konnten die einzelnen Bedingungen der Elektrophorese eingestellt und variiert werden, sowie die fertigen Gelläufe als Graphikdatei (tiff-Format) abgespeichert werden.

Die Elektrophorese wurde bei einer Stromspannung von 1500 V und einer Stromstärke von 20 mA bei 25 W durchgeführt.

3.4.6 RAPD-PCR

Mit RAPD-Analyse (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**N_A: zufällig amplifizierte polymorphe DNA) bezeichnet man eine PCR-Methode, bei der man mit Zufallsprimern Fragmente vervielfältigt, die für das untersuchte Genom repräsentativ sind. Mit diesen Fragmentmustern kann die Genomstruktur verschiedener Individuen miteinander verglichen werden. Der verwendete Primer ist von beliebiger Basensequenz und meist nur kurz, etwa 10 bp lang. Das zu untersuchende Genom braucht dabei nicht bekannt zu sein, der zeitaufwendige Schritt der Genomsequenzierung zur Identifikation bestimmter Primerbindungsstellen entfällt bei dieser Methode, genau wie bei der AFLP-Analyse (Baker 2000). Die entstandenen Fingerprint-Muster können je nach eingesetztem Oligo-Primer einen hohen Informationsgehalt besitzen, der eine Herkunftsanalyse verschiedener Individuen ermöglicht. Ein Vorteil der RAPD-Methode für die Fingerprint-Analysen ist, dass sie wenig Zeit, geringe Mengen an Ausgangsmaterial und wenig technischen Aufwand erfordert (Newton & Graham 1994). Verglichen mit der AFLP-Methode spielt die Reinheit und Menge an DNA keine so entscheidende Rolle. In Verdünnungsreihen mit unterschiedlicher Menge an DNA konnten keine Unterschiede im Bandenmuster festgestellt werden.

Durchführung der RAPD-PCR

Die RAPD-PCR wurde nach einem Standardprotokoll von Williams et al. (1990) durchgeführt. In dieser Arbeit wurden mit Hilfe der RAPD-Methode Maiszünsler aus dem unteren Rheintal (N), aus Spanien (S) und der mediterrane Maisbohrer *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (Lepidoptera: Noctuidae) aus der Laborzucht von Dr. Felix Orthege (Madrid) untersucht (Se). Weiterhin wurden Maiszünsler, die in Bonn aus Beifussbeständen (E) gesammelt wurden, verwendet. Die dabei erzielten Ergebnisse sollten in den bereits durch RAPD-PCR erstellten Stammbaum südwestdeutscher Maiszünslerstandorte (Bodensee, oberes und mittleres Rheintal) integriert werden (Zahn 2002).

S. nonagrioides ist einer der wichtigsten Maisschädlinge im Mittelmeerraum (Gonzalez-Nunez et al. 2000, Konstantopoulou et al. 2002) und soll hier als Vergleich einer anderen Lepidopteren-gattung („outgroup“) mit in die Verwandtschaftsuntersuchung der verschiedenen Maiszünslerstandorte mit eingebracht werden.

Von jeder der beiden Lepidopterenarten wurden je zehn weibliche und zehn männliche adulte Tiere (Imagines) eingesetzt. Eine Übersicht über die in der RAPD-PCR untersuchten Tiere ist in Tab. 3.19 dargestellt. Die DNA-Isolation erfolgte wie in Kapitel 3.4.4 für die AFLP-Untersuchung beschrieben.

Tab.3.19: Übersicht der in der RAPD-PCR untersuchten Individuen

Herkunft	Artname	Abkürzung	Anzahl der untersuchten Individuen
Spanien	<i>Ostrinia nubilalis</i>	S	10 ♀ 10 ♂
Unteres Rheintal (Mais)	<i>Ostrinia nubilalis</i>	N	10 ♀ 10 ♂
Unteres Rheintal (Beifuss)	<i>Ostrinia nubilalis</i>	E	10 ♀ 10 ♂
Laborzucht Spanien	<i>Sesamia nonagrioides</i>	Se	10 ♀ 10 ♂

Es wurden jeweils 1,5 µl DNA eingesetzt. Dies entspricht in etwa einer DNA-Konzentration von 15 - 20 ng/µl. Als Blindprobe wurde bei jedem RAPD-Ansatz an Stelle von DNA die selbe Menge Wasser eingesetzt. Es wurde ein Mastermix für ein Gesamtvolumen von 25 µl pro Ansatz verwendet. Die eingesetzten Bestandteile für die RAPD-PCR sind im Einzelnen in Tabelle 3.20 in Pipettierreihenfolge aufgelistet.

Tab. 3.20: Einzelne Komponenten der RAPD-PCR beim Maiszünsler

PCR-Bestandteil	Volumen im Ansatz	Endkonzentration
H ₂ O	add. bis 25 µl	
PCR-Puffer (10 x)	2,5 µl	1 x
dNTPs (2mM)	2,5 µl	0,2 mM
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl	1,5 mM
Primer (25 pmol/µl)	1 µl	1 µM (1 pmol/µl)
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl	0,5 U (0,02 U/µl)
DNA	1,5 µl	15 – 20 ng

Es wurden insgesamt acht verschiedene Primer mit einer Länge von jeweils zehn Basenpaaren eingesetzt und einem GC-Gehalt von 60-70% (Haymer 1994). Die einzelnen Basensequenzen der jeweiligen Primer sind Tab. 3.21 zu entnehmen. Die lyophilisierten Primer wurden zunächst auf 100 pmol/µl eingestellt (stock solution), mit sterilem Wasser auf eine Arbeitslösung von 25 pmol/l verdünnt, aliquotiert und bis zur Verwendung bei – 20°C gelagert.

Tab. 3.21: Sequenzen der verwendeten RAPD-Primer

Primer	Basensequenz	G/C-Gehalt in %	T _m in °C
Deca 3	5'-CCC AAG GTC C-3'	70	34
Deca 7	5'-CCA CGG GAA G-3'	70	34
Deca 21	5'-GTC TCG TCG G-3'	70	34
Deca 28	5'-GGC CTT CAG G-3'	70	34
Deca 29	5'-GCT CTC ACC G-3'	70	34
A09	5'-GGG TAA CGC C-3'	70	34
A10	5'-GTG ATC GCA G-3'	60	32
A12	5'-TCG GCG ATA G-3'	60	32

Die Primersequenzen A9, A10 und A12 wurden freundlicherweise von Dr. Wolfgang Burgermeister von der BBA in Braunschweig zur Verfügung gestellt. Für die RAPD-PCR wurde ein Biometra-Thermocycler mit dem in Tab. 3.22 beschriebenen Programm bei einer Heizdeckeltemperatur von 100°C verwendet.

Tab. 3.22: PCR-Bedingungen der RAPD-Reaktion (Temperaturprogramm Nr. 2: RAPD)

Schritt	Reaktion	Temperatur	Dauer	Wiederholung
1	Denaturierung	94°C	3 min	1 x
2	Denaturierung	94°C	1 min	40 x
3	Annealing	35°C	1 min	
4	Synthese	72°C	2 min	
5	Auffüllreaktion	72°C	5 min	1 x
6	Kühlung	20°C	2 min	1 x

Die Reproduktion aller RAPD-Reaktionen fand in einem weiteren Thermocycler unter Verwendung des gleichen Temperaturprogramms (RAPD 35) statt.

Der Nachweis der einzelnen amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte in einem Agarosegel (2%) bei 110 V für 3 h. Die genauen Bedingungen der Gelelektrophorese sind Kapitel 3.4.3 zu entnehmen.

Tab. 3.23: Verwendete Geräte und Chemikalien für die molekularen Diversitätsuntersuchungen

I. AFLP- und RAPD-Reaktion:

- Eco RI (10 U/μl) MBI Fermentas
- Mse I /Tru1I (10 U/μl) MBI Fermentas
- Restriktionspuffer Y⁺/Tango™ : MBI Fermentas
 - 33 mM Tris-Acetat, 10 mM Magnesiumacetat,
 - 66 mM Kaliumacetat, 0,1 mg/ml BSA, pH 7,9
- Wasser (Molecular Biology Grade) Eppendorf
- 1,5 ml Reaktionsgefäße Eppendorf
- T4 DNA- Ligase (1U/μl) MBI Fermentas
- Ligationspuffer : MBI Fermentas
 - 400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂
 - 100 mM DTT, 5 mM ATP, pH 7,8
- +A / +C Ligationsadaptoren MWG-Biotech
- Primer (+ 1/ + 3) MWG-Biotech
- RAPD Deca-Primer MWG-Biotech
- Pipetten und Pipettenspitzen Eppendorf
- Pipettenspitzen mit Filter Biozym
- 0,2 ml PCR-Strips Boehringer/Roche
- Thermocycler UNO (AFLP) Biometra
- Thermocycler PTC 100 (RAPD) MJ Research

II. Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

- Long Ranger® 50 % Gellösung BioWhittaker Molecular Applications BMA
- 5 x TBE, nicht-fluoreszierend: Eppendorf
 - 0,45 M Tris Borat
 - 0,01 M EDTA, pH 8,3
- Harnstoff, nicht-fluoreszierend Roth
- 10% Ammoniumpersulfat (NH₄)₂S₂O₈ Sigma
- TEMED Sigma
(Tetramethylethyldiamin C₆H₁₆N₂)
- Ultraschallbad Transsonic 460 Elma®
- 50-350 sizing standard Li-cor®

- | | |
|---|----------------------------|
| - Loading Dye: | Amersham Pharmacia Biotech |
| • 95 % Formamid | |
| • 0,5 mM EDTA | |
| • 0,1 mg/ml Fuchsinrot | |
| - 50 ml Glasspritze | Walter Graf & Co. |
| - Spritzen-Sterilfilter, 0,8 µm (Rotilabo®) | Roth |
| - 64 Well Sharktooth-Kamm (0,25 mm) | Li-cor® |
| - Abstandhalter (spacer) 0,25 mm | Li-cor® |
| - automatisierter DNA-Sequenzierer
(Li-cor® 4200-2L) | Li-cor® |
| - Steuerungssoftware E-Seq 1.1 | Li-cor® |

3.4.7 Auswertung der DNA-Fingerprint-Techniken

Sowohl bei den AFLP, wie auch bei den RAPD-Daten wurden nur solche Gele ausgewertet, die in ihrem Fragmentmuster reproduzierbar waren. Dafür wurden sämtliche Reaktionen mit derselben Ausgangs-DNA mindestens zweimal ausgeführt und die entstandenen Bandenmuster visuell miteinander verglichen.

Mit Hilfe des Polymorphiegrades (**PG**) können Aussagen zur genetischen Variabilität gemacht werden. Dafür wurde zunächst der Monomorphiegrad festgestellt. Zur Ermittlung des Monomorphiegrades (**MG**) werden die Anzahl monomorpher Banden durch die Gesamtzahl aller auftretenden Banden eines Individuums dividiert. Als monomorphe Banden werden nur solche Banden bezeichnet, die bei allen Individuen einer Population oder eines Standortes vorkommen, also konstant sind. Die Gesamtzahl aller innerhalb einer Population vorkommenden Banden ist mit **n** bezeichnet.

$$\mathbf{MG} = (m/n)$$

m = Anzahl monomorpher Banden

n = Gesamtzahl aller Banden innerhalb einer Population/Standort

Mit Hilfe des Monomorphiegrades lässt sich der Polymorphiegrad bestimmen:

$$\text{PG (\%)} = (1 - \text{MG}) \times 100$$

Unterschieden wird hierbei zwischen dem internen Polymorphiegrad, bei dem nur die Anzahl der möglichen Banden n innerhalb einer untersuchten Gruppe (Population/Standort/Rasse) gewertet wird und dem Gesamtpolymorphiegrad, der die Gesamtheit der möglichen Banden aller untersuchten Gruppen berücksichtigt.

Zur Auswertung des Auftretens der einzelnen Banden bei den verschiedenen Individuen wurde das Bandenmuster des Gels in eine 0/1-Matrix umgewandelt, bei dem bei Vorhandensein einer Bande eine 1 und bei Abwesenheit eine 0 zugeordnet wird. Diese Daten konnten mittels des Computerprogramms TREECON (van de Peer & de Wachter 1994) in eine Distanzmatrix umgerechnet werden.

Zur Berechnung der genetischen Distanzen (**GD**) wurde dabei folgende Formel benutzt:

$$\text{Gd}_{xy} = 1 - (2n_{xy} / n_x + n_y) \times 100$$

Mit Hilfe dieser Formel nach Nei & Li (1979) wurden die durchschnittlichen Distanzen innerhalb der verschiedenen Stichproben ermittelt. Mit diesen Werten konnten die numerischen Verfahren zur Erstellung der Distanzmatrix und zur Clusteranalyse als Grundlage der Dendrogramme durchgeführt werden.

Mittels der Distanzmatrix können die genetischen Distanzen eines Individuums im Verhältnis zu anderen Individuen prozentual dargestellt werden. Genetische Distanzen sind analog zu geometrischen Distanzen, was bedeutet, dass eine genetische Distanz von 0 äquivalent zu keiner messbaren genetischen Differenz zwischen den untersuchten Gruppen ist (Hedrick 2000). Aus diesen Werten wurde die durchschnittliche Distanz eines Individuums innerhalb einer gegebenen Population (Standort) und zwischen den verschiedenen Populationen errechnet und die Standardabweichung bestimmt. Um die verwandtschaftlichen Verhältnisse der untersuchten Individuen miteinander zu vergleichen und sie graphisch darzustellen, wurden mit Hilfe von Clusteranalysen Dendrogramme erstellt. Die Zuverlässigkeit der einzelnen Verzweigungen der Dendrogramme wurde über 100 Bootstrap-Wiederholungen (Felsenstein 1985) bestätigt. Es wurden insgesamt drei verschiedene Clusterverfahren durchgeführt:

Neighbour-Joining (NJ, Saitou & Nei 1987)

Diese Methode konstruiert das Dendrogramm ausgehend von dem ähnlichsten Paar (OTU – operational taxonomic unit) zweier Individuen und verbindet diese entsprechend der höchsten Ähnlichkeit mit anderen. Die OTU durchlaufen dabei mehrere Zyklen in denen jeweils Paare gebildet werden, die dann als neue Einheit mit einem dritten OTU verbunden werden.

UPGMA (Sneath & Sokal 1973)

unweighted pair-group method using arithmetic averages

(ungewichtete Paar-Gruppierungsmethode unter Anwendung des arithmetischen Mittels)

Bei diesem Verfahren werden die einzelnen Individuen nach den arithmetischen Mitteln der genetischen Distanzen einer OTU miteinander kombiniert. Da der arithmetische Mittelwert der genetischen Distanzen berechnet wird, ermöglicht dieses Verfahren eine größere Unabhängigkeit gegenüber Ausreißern in den Distanzwerten.

Um die Daten nach populationsbiologischen Aspekten auszuwerten, wurde zusätzlich mit dem Computerprogramm POPGENE gearbeitet. Dabei wurden für jede Population die Allelfrequenzen der Fragmente als Maß für die genetische Diversität bestimmt (Nei 1978).

Formel für Nei's Index genetischer Distanz:

$$I_N = -\log_e \frac{\sum_{i=1}^m (p_{ix} p_{iy})}{\left[\left(\sum_{i=1}^m p_{ix}^2 \right) \left(\sum_{i=1}^m p_{iy}^2 \right) \right]^{1/2}}$$

Formel für Nei's Index genetischer Ähnlichkeit:

$$D_N = e^{-I_N}$$

p_{ix} = Frequenz von Allel i in der Population x

p_{iy} = Frequenz von Allel i in der Population y

m = Anzahl der Allele auf dem spezifischen Locus

Tab. 3.24: Für AFLP- und RAPD-Auswertung verwendete Computerprogramme

- E-Seq 1.1	Firma Li-cor®
- Adobe Photoshop 7.0	
- AFLP-Analysesoftware Saga™ 2.1	Firma Li-cor®
- Datenbank Oracle 8i Personal 8.1.7	
- statistische Auswertung SIGMASTAT	Jandel Scientific
- TREECON for Windows 1.3b	
- POPGENE	

3.5 Toxizitätstest

Um die Basis-Empfindlichkeit (Suszeptibilität) der Larven verschiedener Populationen gegenüber dem in den transgenen Pflanzen exprimierten Toxin festzustellen, wurde ein Toxizitätstest mit Bt-Toxin verwendet. Für die Durchführung der Suszeptibilitätstests wurden Biotestplatten aus Kunststoff eingesetzt, die pro Platte in 128 runde Vertiefungen mit 2 ml Volumen aufgeteilt waren (8 Felder mit 16 Vertiefungen). Bei einer Füllhöhe von 1 ml Nährmedium, entsprach dies einer Fläche von $1,77 \text{ cm}^2$. Jedes Feld wurde mit einer selbstklebenden durchsichtigen Folie verschlossen, um ein Entweichen der Larven zu verhindern. Zusätzlich sorgten kleine Löcher in der Oberfläche für eine ausreichende Belüftung während des Tests. In Abbildung 3.7 ist eine solche mit Nährmedium befüllte und verschlossene Testplatte zu erkennen. Die Testplatten wurden nach einer Desinfektion (in 1% Kohrsolinlösung für eine Woche) gründlich ausgespült und für weitere Testreihen wiederverwendet.

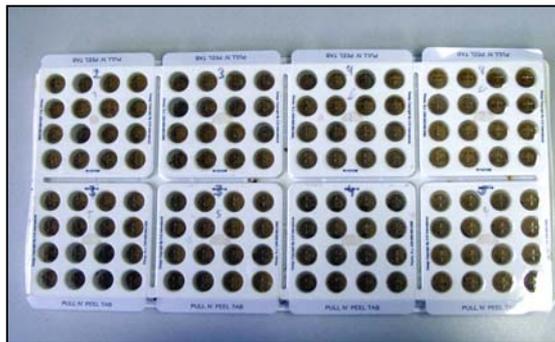


Abb. 3.7: Aufsicht auf die verwendeten Biotestplatten, die mit Medium befüllt sind und durch aufgeklebte Deckfolien verschlossen wurden.

3.5.1 Bt Toxine

Die verwendeten Bt-Toxine wurden von den Firmen Novartis Seeds AG, Basel (jetzt Syngenta), Monsanto Company, St. Louis, Missouri und Mycogen Corporation, San Diego (jetzt Dow Agrosiences) zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um ein Cry1Ab-Protoxin, ein verkürztes (truncated) Cry1Ab-Toxin und ein kommerzielles Cry1Ac-Toxin. Das Protoxin bestand aus Cry1Ab-Kristallen, die aus einer Bakterienkultur von *B. thuringiensis* ssp. *kurstaki* HD 1-9 Stämmen isoliert wurden, die nur Cry1Ab Protein produzieren (Minnich & Aronson 1984). Um einen Vergleich mit der BBA zu gewährleisten, wurde im Verlauf des Projektes das von Dr. Johannes Jehle von der Staatlichen Lehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Weinbau und Gartenbau (SLFA) in Neustadt produzierte verkürzte Cry1Ab-Toxin (Neustadt-Toxin) übernommen. Alle in dieser Arbeit verwendeten Toxine sind in Tab. 3.25 aufgelistet.

Tab. 3.25: In den Biotests verwendete Bt-Toxine

Herkunft	Toxin	Herstellung	Konzentration	Lagerung
Syngenta (Novartis)	natives Cry1Ab (Protoxin)	aus Bakterienkulturen isoliert	75,4 %	lyophilisiert
Monsanto	Cry1Ab (truncated)	trypsinisiertes Kernprotein	3,21 mg/ml	gelöst in 50 mM Carbonat/Bicarbonatpuffer pH 10,25 (-20°C)
SLFA Neustadt	Cry1Ab (truncated)	trypsinisiert	25 mg/ml	gelöst in CAPS-Puffer pH 10,5 (-20°C)
Mycogen (Dow Agrosiences)	Cry1Ac (MVPII®)	bakterielles Cry1Ac aus transgenen <i>Pseudomonas</i> Kulturen	216 mg/ml	gelöst (RT) (kommerzielle Formulierung)

3.5.2 Untermischmethode

Die Zubereitung des Nährmediums erfolgte wie bei der Futterzubereitung für die Zucht (siehe Kap. 3.2), allerdings ohne Zugabe der Antibiotika Chlortetracyclin und Fumidil.

In Vortests wurde die effektive Toxinkonzentration ermittelt bei der durchschnittlich die Hälfte der Larven starben. Zusätzlich wurden in Vorversuchen die einzelnen Konzentrationsstufen für die jeweiligen Toxine festgelegt.

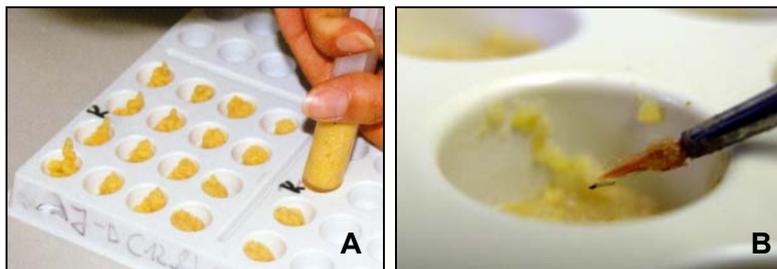


Abb. 3.8: Die einzelnen Schritte der Testzubereitung:

A: 1 ml des Nährmediums werden mit einer Spritze in die Vertiefungen gegeben.

B: Die Larven werden einzeln mit Hilfe eines Pinsels in die mit Medium befüllten Vertiefungen der Testplatten gesetzt.

Nach Erkalten des Mediums wurden 35 g in einen Porzellanmörser gegeben und mit 4 ml der entsprechenden Toxinlösung vermischt. Verschiedene Konzentrationen des Cry1Ab-Toxins wurden hergestellt. Die einzelnen Konzentrationsstufen und die Anzahl der Testwiederholungen sind Tab. 3.26 zu entnehmen. Pro Konzentration wurden 32 Larven getestet, 64 Larven kamen in Kompartimente ohne Toxin und dienten als Kontrolle.

Wie in Abb. 3.8 zu erkennen, wurde jeweils 1 ml des Agar-Nährmediums mit einer Spritze in die einzelnen Abteile der Biotestplatten eingefüllt. In jede Vertiefung wurde mit Hilfe eines dünnen Pinsels eine Larve gesetzt. Die verwendeten L1- Larven waren jünger als 24 h (neonate Larven) und ungefüttert. Pro Test wurde immer nur ein Standort einer definierten Generation mit einem der Toxine getestet. Die Biotestplatten wurden zugeklebt und im Dunkeln in einer Klimakammer bei 25°C aufbewahrt. Nach sieben Tagen konnte der Test ausgewertet werden.

3.5.3 Oberflächenapplikation

Für diese Methode wurde ein anderer Agar verwendet, da das Medium länger flüssig bleiben musste. Nach Vermischung aller Bestandteile (ohne Fumidil und Chlortetracyclin) wurde das noch heiße Medium in einem Wasserbad auf einem Magnetrührer weiter erhitzt, damit es flüssig blieb. Mit Hilfe eines Handdispensers (Multipette®) wurde jeweils 1 ml Medium in die einzelnen Vertiefungen der Biotestplatte pipettiert. Daraus ergab sich eine Oberfläche von 1,77 cm². Nach etwa 30 Minuten war das Medium fest geworden. Anschließend wurden auf die glatte Oberfläche je 100 µl der hergestellten Toxinlösung gegeben. Auch hier wurden pro Toxinkonzentration 32 neonate Larven eingesetzt. Als Kontrolle wurde, je nach Ansatz der Toxinlösung, 100 µl Wasser oder CAPS-Puffer auf das Medium pipettiert. Bis zum vollständigen Antrocknen der Toxinlösung wurden die fertigen Platten für 2 - 3 Stunden bei 37°C gelagert. Danach wurden die L1-Larven auf das Medium gesetzt und ebenfalls für 7 Tage bei 25°C im Dunkeln aufbewahrt.

Tab. 3.26: Die Konzentrationsstufen der eingesetzten Toxine und die Anzahl der Testwiederholungen

Toxin	Konzentrationsstufen in µg/g Medium	Testanzahl
1. Untermischmethode:		
Cry1Ab truncated (Monsanto)	2; 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,025; 0,012	10
Cry1Ab truncated (Neustadt)	16; 8; 4; 2; 1; 0,5; 0,2	6
Cry1Ab Protoxin (Novartis)	8; 6; 4; 2; 0,2	4-7
Cry1Ac natives Toxin (MVPII, Mycogen)	1,4; 0,7; 0,35; 0,17; 0,085	6
2. Oberflächentest:		
Cry1Ab truncated (Monsanto)	2,5; 0,625; 0,3; 0,156; 0,08; 0,04; 0,02	5
Cry1Ab truncated (Neustadt)	5; 2,5; 1,125; 0,625; 0,3; 0,156; 0,08	5

3.5.4 Testauswertung

Nach 7 Tagen wurde die Zahl der gestorbenen Larven bei jeder Bt-Toxin Stufe bestimmt und die Mortalitätsrate in % berechnet. Mit Hilfe des Statistikprogramms ToxRat (2003) wurde eine Probitberechnung durchgeführt und der LC_{10} , LC_{20} , LC_{50} und LC_{90} bestimmt. Weiterhin wurden Steigung und Konfidenzintervalle berechnet. Aus den LC-Werte der einzelnen Tests konnten dann der Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler ermittelt werden. Nach einer Prüfung der Daten auf Normalverteilung und gegebenenfalls einer $\log(x+1)$ -Transformation wurden die Werte mittels einer Varianzanalyse verglichen.

Tab. 3.27: Für die Toxizitätstests verwendetes Material

- Biotestplatten (Bio-Ba-128)	Color-Dec, Italien
- Aufkleberfolien mit Belüftung (Bio-Cv-16)	Color-Dec, Italien
- Porzellanmörser	
- 60 ml Plastikspritze	B-D Plastipak
- Pinsel (Gr. 1)	
- Parafilm „M“	American National Can ^{TT}
- Handdispenser Multipette [®] plus	Eppendorf
- Combitips [®] 50 ml; 2,5ml	Eppendorf
- Agar-Agar, Kobe I, pulverisiert (nur beim Oberflächentest)	Roth
- 50 mM CAPS – Puffer, pH 10,5 (Cyclohexylaminopropansulfonsäure $C_9H_{19}NO_3S$)	Roth

3.6 Selektion auf toxinhaltigem Futter

Die überlebenden Larven der höchsten drei Toxinkonzentrationen wurden gesondert gesammelt und weitergezüchtet. Ihnen und ihren Nachkommen wurde Nährmedium mit untergemischtem verkürztem (truncated) Toxin von Monsanto (s. Tab. 3.25) gegeben. Die verabreichte Toxinkonzentration von 0,03 µg/g Nährmedium richtete sich zunächst nach dem LC₂₀ der vorangegangenen Untermisch-Tests mit Monsanto-Toxin. Dieser Wert wurde nach 6 Generationen der Toxinüberlebenden (TOX) auf 0,055 µg/g erhöht und nach weiteren sechs Generationen auf 0,1 µg/g angehoben. Ab der 9. Generation wurden Suszeptibilitätstests mit Monsanto-Toxin nach der Untermischmethode durchgeführt, um eine mögliche Veränderung in der Basisempfindlichkeit festzustellen. Danach wurde nochmals sechs Generationen später die zugegebene Toxinmenge auf 0,2 µg/g verdoppelt.

Parallel zu diesen Tests wurden die Larven in Petrischalen auf Maisblätter gesetzt, die auf angefeuchtetem Papier lagen. Auf jedes Blatt wurden 5 ungefütterte L1-Larven (< 24 h alt) gesetzt. Dabei wurden die Maissorten „Novelis“ (+ Bt-Event) und „Nobilis“ (isogene Kontrolle) eingesetzt. Insgesamt wurden 10 Ansätze verwendet. Nach 5 Tagen im Klimaschrank 1 (L: D 16:8, Temperatur 25:22 ± 1°C, 70 % RH) wurde die Mortalitätsrate bestimmt.

3.7 Sammeln von Maiszünslern in transgenen Maisparzellen

Um bereits potentiell selektierte Maiszünsler mit erhöhter Cry1Ab Resistenz aufzuspüren, wurde soweit dies möglich war, die Gelegenheit genutzt in Versuchsfeldern mit transgenem Mais nach überlebenden Maiszünslerlarven zu suchen. Dafür konnte im Jahr 2000 ein Versuchsstandort der Firma Monsanto im Breisgau untersucht werden. Trotz gründlicher Suche konnten hier weder Tiere noch Fraßspuren entdeckt werden. Jeweils im Herbst 2001-2003 wurde auf einem Versuchsfeld der RWTH in der Nähe von Rheinbach ebenfalls nach überlebenden Tieren in einer ½ ha großen Bt-Parzelle gesucht. In Zusammenarbeit mit der Firma Monsanto, die das Saatgut zur Verfügung stellte, wurden auf dieser Fläche Monitoringversuche mit der transgenen Sorte „Novelis“, die das Event MON 810 enthält, durchgeführt. Im Jahr 2002 wurden an 4 Pflanzen lebende L5-Larven gefunden, allerdings kaum Fraßspuren. Erfahrungen aus der Praxis zeigen, dass 2 % - 4 % der Maispflanzen das Bt-Gen nicht besitzen oder unzureichend exprimieren (Bolin et al. 1998, Magg et al. 2001). Um auszuschließen, dass es sich bei dem befallenen Bt-Mais um solche Pflanzen handelte, wurden vor Ort Blatt- und Kolbenproben der befallenen Pflanzen entnommen und um eine Degradierung der DNA zu vermeiden, diese sofort in flüssigen Stickstoff gegeben.

3.8 DNA-Nachweismethode für gentechnisch veränderten Mais

Um den Mais auf das Vorhandensein neu eingebrachter Gensequenzen zu untersuchen, wurde im Labor zunächst eine DNA-Isolierung durchgeführt. Aus Zeit- und Kostengründen wurde die Salzextraktionsmethode nach Aljanabi & Martinez (1997) ausgewählt und leicht modifiziert (Saeglitz 1999). Zur Detektion der transgenen DNA wurde die PCR-Methode angewandt (Saiki et al. 1988). Der Nachweis der transgenen DNA und die Auswahl der Primer erfolgte nach Zimmermann et al. (1998). Nach Vorversuchen wurden hier allerdings nur zwei anstatt wie angegeben vier Primer verwendet (mg1 und mg2). Beide Primer haben eine Länge von 25 Basenpaaren. Primer mg1 basiert auf Teilen der Sequenz des viralen 35S-Promotors, die Basenabfolge von Primer mg2 beinhaltet Teile des maisspezifischen Hitzeschockproteingens Hsp70 (siehe Kap. 2.3.6). Durch die Kombination dieser beiden Primer ist ein Amplifikationsprodukt nur zu erwarten, wenn es sich tatsächlich um transgenen Mais der Linie MON 810 (MaisGard™) der Firma Monsanto handelt. Die genaue Sequenz und Spezifität der einzelnen Primer ist Tab. 3.28 zu entnehmen.

Tab. 3.28: Basensequenz der Primer für den Nachweis von gentechnisch verändertem Mais (MON 810)

Primer	Basenabfolge	Gensequenz
mg1	5'- TAT CTC CAC TGA CGT AAG GGA TGA C -3'	MaisGard P-35S
mg2	5'- TGC CCT ATA ACA CCA ACA TGT GCT T -3'	Hsp70 Intron 1

Die beiden Primer sollten bei einer positiven Probe ein 401 bp großes Amplifikationsprodukt bilden. Als Positivprobe wurde eine Blattprobe einer transgenen Maispflanze aus dem Gewächshaus genommen, bei der vorher durch einen Biotest ein Absterben von Maiszünslerlarven beobachtet werden konnte. Als Negativkontrollen dienten vier Pflanzenproben aus der isogenen Nachbarparzelle des Versuchsfeldes. Bei der Blindprobe wurde an Stelle von DNA die selbe Menge Wasser eingesetzt. Die PCR wurde in 200 µl Reaktionsgefäßen durchgeführt - der genaue Ablauf der PCR ist in Tab. 3.29 aufgelistet - und die entstandenen Amplifikationsprodukte auf einem 1 %igen Agarosegel in TAE-Puffer bei einer Stromstärke von 100 V aufgetrennt. Als Längenstandard diente ein λEco 47 I Marker (Abb. 3.4). Der Nachweis der DNA erfolgte durch Ethidiumbromid im Gel unter UV-Licht.

Tab. 3.29: PCR Temperaturprogramm (MAIS1)

<u>step</u>	<u>Dauer</u>	<u>Temperatur</u>
1	3'	95°C
2	45''	95°C
3	50''	60°C
4	50'	72°C
5	35 x step 2 – 4	
6	3'	72°C
7	30'	4°C

4. Ergebnisse

4.1 Genetische Charakterisierung unterschiedlicher Maiszünslerpopulationen

4.1.1 AFLP-Methode

4.1.1.1 Optimierung der Restriktion

Um die richtige Menge an einzusetzender DNA für die Restriktion zu bestimmen, wurden verschiedene Mengen an Maiszünsler-DNA für den Verdau verwendet. Die Restriktion ist einer der empfindlichsten Schritte für die AFLP-Analyse. Ein unvollständiger Verdau der DNA führt zu signifikanten Problemen und beeinflusst den Erfolg aller darauffolgenden Schritte (Baker 2000). Fragmente, die durch einen unvollständigen Verdau entstehen, können bei der Auswertung als falsche Polymorphismen interpretiert werden und die gesamte Analyse verfälschen (Reineke et al. 1998). In Abb. 4.1 ist das Ergebnis der Restriktion mit unterschiedlichen DNA-Konzentrationen dargestellt. Es zeigt, dass für den Verdau eine DNA-Menge von 40 µg ein optimales Ergebnis erzielt, bei dem ein vollständiger Verdau stattgefunden hat, erkennbar an dem gleichmäßigem „Schmier“ über die Länge des Gels.

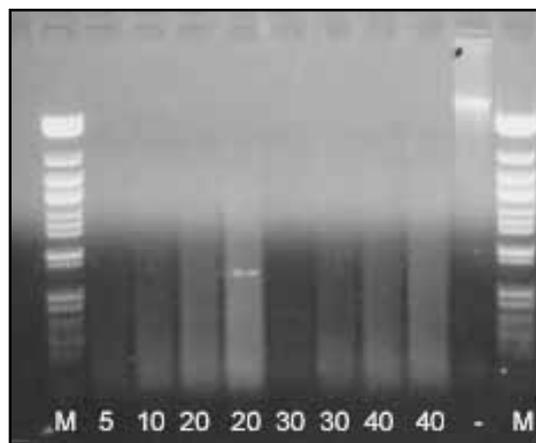


Abb. 4.1: Restriktion von Gesamt-Maiszünsler-DNA mit den Enzymen EcoRI und Mse (Trul) bei verschiedenen DNA Konzentrationen von 5 µg – 40 µg DNA. –: Negativkontrolle (unverdaute DNA), **M:** Marker (DNA-ladder Eco 47/I).

4.1.1.2 Verwendete Primerkombinationen

Bei der AFLP-Analyse wurden Maiszünsler unterschiedlicher Herkünfte und Wirtspflanzen (Mais und Beifuss), sowie eine andere Lepidopterenart, *Plutella xylostella*, als Vergleich („outgroup“) untersucht. Mit den verwendeten neun verschiedenen Primerkombinationen konnten insgesamt 254 amplifizierte AFLP-Fragmente ausgewertet werden. Je nach eingesetzter Primerkombination variierte die Anzahl an ausgewerteten Banden zwischen 21 und 40 Fragmenten. Es wurden bei allen Gelen nur Banden bis zu einer Größe von 400 bp ausgewertet, da bei allen größeren Fragmenten die Detektion auf dem Gel qualitativ schlechter und stellenweise zu schwach zum Auswerten wurde. Die genaue Anzahl an verwendeten Banden für jede Primerkombination ist in Tab. 4.1 aufgelistet. Es wurden nur solche Banden berücksichtigt, die für jede Primerkombination und jede der eingesetzten DNA-Proben mindestens einmal reproduziert werden konnte. In Abb. 4.2 ist beispielhaft ein AFLP-Gel der Populationen Karlsruhe (K), Oderbruch (O) und Spanien (S) mit der Primerkombination E-AGG/ M-AGA dargestellt.

Tab. 4.1: Anzahl der ausgewerteten Banden für jede der neun unterschiedlichen Primerkombinationen.

AFLP- Primerkombination	Anzahl ausgewerteter Banden pro Primerkombination
M- ACT / E-AGG	25
M- AGA / E-AGG	30
M- AGT / E-AGG	40
M- ATA / E-AGG	27
M- CAT / E-AGG	21
M- CCA / E-AGG	26
M- CTA / E-AGG	24
M- CTG / E-AGG	26
M- CTT / E-AGG	35
Σ	254

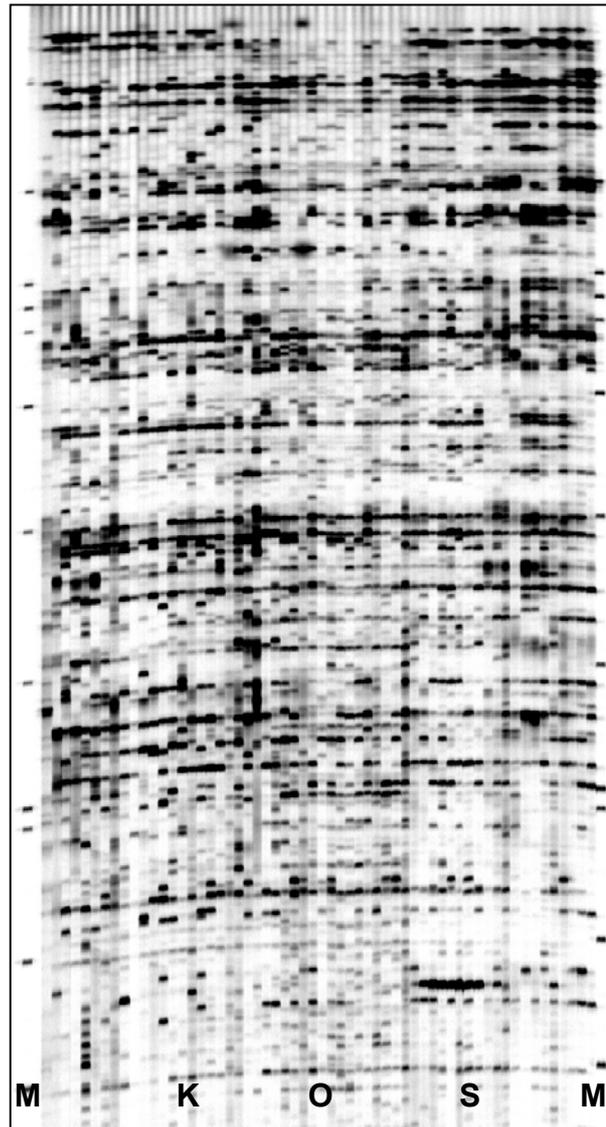


Abb. 4.2: Ausschnitt aus einem AFLP-Gel der Populationen Karlsruhe (K), Oderbruch (O) und Spanien (S) mit der Primerkombination E-AGG/ M-AGA. Es wurde jeweils die DNA von 10 weiblichen und 10 männlichen Tiere jeder Population verwendet. An beiden Seiten befindet sich der Längenstandard M (50-350 bp).

4.1.1.3 Polymorphiegrad und Shannon-Index

Um ein Maß für die genetische Diversität zu erhalten wurde der Shannon-Index ermittelt. Dazu wurde das Computerprogramm Popgene eingesetzt. Die einzelnen Werte für die verschiedenen Standorte sind Tab. 4.2 zu entnehmen. Mit n wird die Anzahl der eingesetzten Individuen angegeben.

Tab. 4.2 Shannon-Index (genetische Diversität) und Standardabweichung ermittelt auf Grund des AFLP-Bandenmusters. Der Shannon Index wurde zum einen soweit möglich für Männchen und Weibchen getrennt und zum anderen zusammen für Männchen und Weibchen angegeben.

Standort	n	Shannon-Index	Standardabweichung	Shannon-Index ^{w+m} (Stabw)
Bodensee weiblich	10	0,0688	0,1767	0,0838 (0,1883)
Bodensee männlich	10	0,0720	0,1788	
Bonn (Mais) weiblich	10	0,1018	0,2142	0,1196 (0,2232)
Bonn (Mais) männlich	10	0,0856	0,2000	
Bonn (Beifuss) weiblich	10	0,0611	0,1746	0,0759 (0,1900)
Bonn (Beifuss) männlich	10	0,0571	0,1704	
Freiburg weiblich	10	0,0743	0,1807	0,0866 (0,1902)
Freiburg männlich	10	0,0761	0,1825	
Halle	20	0,0799	0,1872	0,0799 (0,1872)
Karlsruhe weiblich	10	0,0791	0,1880	0,0962 (0,2042)
Karlsruhe männlich	10	0,0792	0,1903	
Oderbruch	20	0,1237	0,2225	0,1237 (0,2225)
Spanien weiblich	10	0,0780	0,1894	0,0942 (0,2068)
Spanien männlich	10	0,0545	0,1624	
<i>P. xylostella</i>	10	0,0362	0,1264	0,0362

Der Shannon-Index lag bei allen untersuchten Populationen zwischen 0,12 und 0,03. Die Maiszünsler des Oderbruchs zeigten mit einem Shannon-Index von 0,12 die höchste genetische Diversität. Ebenfalls eine hohe genetische Diversität wies die Population Unteres Rheintal/Bonn (Mais) auf. Betrachtete man die Männchen und Weibchen dort zusammengefasst (rechte Tabellenspalte) so betrug auch hier der Wert 0,12. Ansonsten lag bei allen anderen Maiszünslerpopulationen der Shannon-Index sehr dicht beieinander (zwischen 0,08 und 0,09), wenn Männchen und Weibchen der jeweiligen Populationen nicht unterschieden wurden. Die geringste genetische Diversität fand sich mit einem Shannon-Index von 0,03 bei dem Laborstamm von *P. xylostella*. Der Polymorphiegrad wurde ebenfalls durch die Popgene-Auswertesoftware errechnet und ist mit der Anzahl polymorpher Banden für jeden Standort in Tab. 4.3 aufgelistet.

Tab. 4.3: Anzahl polymorpher Banden und Polymorphiegrad (PG) in % für die untersuchten Maiszünslerpopulationen nach AFLP Analyse.

Population	polymorphe Banden	PG (%)
Bodensee B	49	19,29
Unteres Rheintal (Mais) N	70	27,56
Unteres Rheintal (Beifuss) E	40	15,75
Oberes Rheintal F	54	21,26
Halle H	47	18,50
Mittleres Rheintal K	55	21,65
Oderbruch O	72	28,35
Spanien S	54	21,26
<i>Plutella xylostella</i> P	23	9,06

Betrachtet man nur die Maiszünslerpopulationen schwankt der Polymorphiegrad nicht stark und liegt zwischen 16 % für Unteres Rheintal (Beifuss) und je 28 % bei der Population Unteres Rheintal (Mais) und Larven aus dem Oderbruch. Vergleicht man die Ergebnisse des Polymorphiegrads und des Shannon-Index so zeigt sich, dass in beiden Fällen die höchsten Werte bei Tieren aus dem Oderbruch und Unteres Rheintal (Mais) zu finden sind. Den niedrigsten Wert zeigt *P. xylostella* mit einem Polymorphiegrad von 9%

4.1.1.4 Genetische Distanz und genetische Ähnlichkeit

Nach Nei (1978) wurden die genetischen Distanzen und die genetische Ähnlichkeit anhand der Distanzmatrix ermittelt. Dabei wurden Gruppenpaare gebildet und die genetische Distanz aller möglichen Gruppenpaare zueinander bestimmt. Die einzelnen Werte sind in Tab. 4.4 aufgeführt. Bei den Angaben für die genetische Distanz handelt es sich um relative Einheiten. Je kleiner ihr Wert wird, umso geringer ist auch die Distanz zwischen den einzelnen Gruppen, also Populationen, oder Tieren unterschiedlicher Wirtspflanzen (Mais oder Beifuss).

Tab. 4.4: AFLP-Analyse: Genetische Ähnlichkeiten (Werte über der Diagonalen) und genetische Distanzen (Werte unterhalb der Diagonalen) nach Nei (1972).

	Bodensee	Oberes Rheintal	Halle	Mittleres Rheintal	Oderbruch	Spanien	Unteres Rheintal Beifuss	Unteres Rheintal Mais	<i>Plutella xylostella</i>
Bodensee	****	0,7751	0,7579	0,8002	0,7977	0,7392	0,7485	0,8011	0,3798
Oberes Rheintal	0,2547	****	0,8171	0,8361	0,7788	0,7929	0,7274	0,8255	0,4839
Halle	0,2772	0,2020	****	0,8070	0,8262	0,7420	0,7478	0,8072	0,4605
Mittleres Rheintal	0,2228	0,1790	0,2144	****	0,8064	0,7969	0,7906	0,8522	0,4150
Oderbruch	0,2260	0,2500	0,1910	0,2152	****	0,7661	0,7820	0,8356	0,4776
Spanien	0,3022	0,2321	0,2984	0,2270	0,2665	****	0,7182	0,7700	0,4256
Unteres Rheintal Beifuss	0,2897	0,3183	0,2907	0,2350	0,2459	0,3310	****	0,8851	0,4861
Unteres Rheintal Mais	0,2217	0,1917	0,2141	0,1599	0,1795	0,2613	0,1221	****	0,4869
<i>Plutella xylostella</i>	0,9680	0,7260	0,7754	0,8794	0,7390	0,8543	0,7214	0,7197	****

Die Distanzen zwischen *P. xylostella* und einzelnen Maiszünslerpopulationen sind erwartungsgemäß am höchsten (0,97–0,72). Die Distanzen innerhalb der Maiszünslerpopulationen variieren zwischen 0,1599 bei den Rheintalpopulationen und 0,3 beim Vergleich der spanischen Maiszünsler mit den deutschen Populationen. Die geringste genetische Distanz (0,1221) besteht zwischen den Bonner Maiszünslern der beiden verschiedenen Wirtspflanzen. Dementsprechend ist hier auch die größte genetische Ähnlichkeit zu finden (0,8851), die geringsten Ähnlichkeiten bestehen erwartungsgemäß zwischen deutschen und spanischen Maiszünslern (0,72–0,79). Der Mittelwert der genetischen Ähnlichkeit beträgt für alle Maiszünslerpopulationen 0,7904 ($\pm 0,007$), betrachtet man nur die deutschen Populationen liegt der Wert bei 0,8003 ($\pm 0,008$).

Um die verwandtschaftlichen Verhältnisse der untersuchten Individuen miteinander zu vergleichen und sie graphisch darzustellen, wurden mit Hilfe von Clusteranalysen Dendrogramme erstellt.

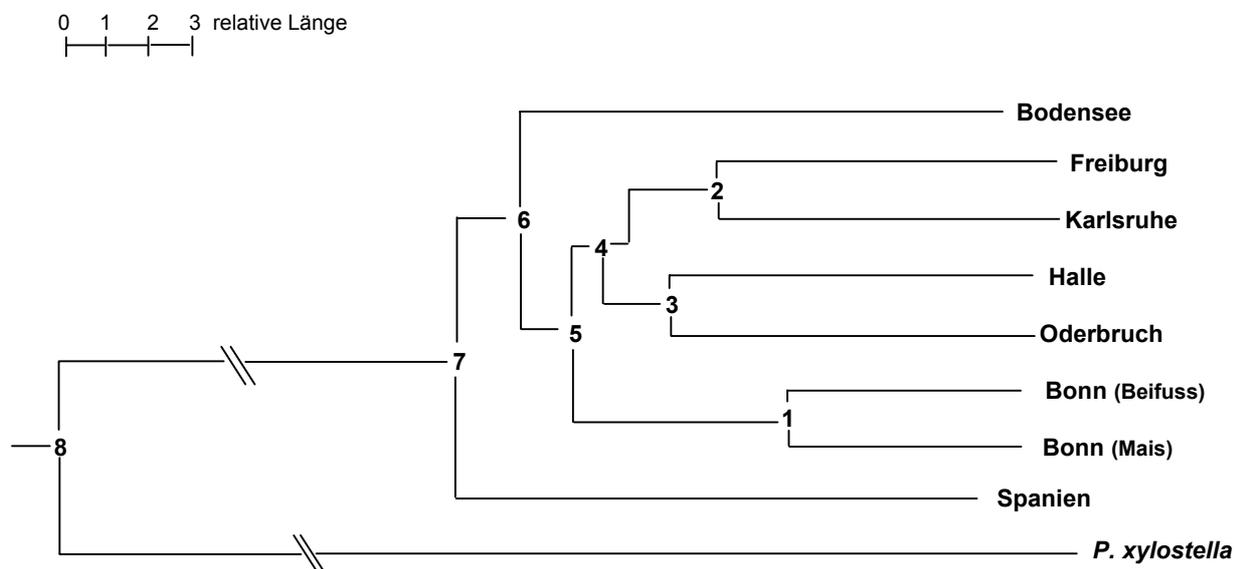


Abb.4 3: Dendrogramm erstellt mit Poppene nach der UPGMA-Methode. Die waagerechten Linien verdeutlichen maßstabsgetreu die ermittelten Längen aus der folgenden Tabelle 4.5.

Die in Abb. 4.3 dargestellten AFLP-Ergebnisse zeigten, dass *P. xylostella* als „outgroup“ die größte genetische Distanz (39,90) zu den anderen Gruppen aufwies. Die Werte der relativen Längen zwischen den einzelnen Gruppen können der Tab. 4.5 entnommen werden.

Weiterhin verdeutlicht dieses Dendrogramm die relativ geringen Abstände innerhalb der verschiedenen Maiszünslerpopulationen. Dabei grenzten sich die untersuchten Maiszünsler aus Spanien geringfügig von den deutschen Populationen ab (7 - 6: 1,27). Innerhalb der deutschen Populationen distanzierte sich die Region Bodensee ein wenig von den Rhein-Populationen und den ostdeutschen Populationen aus Halle und dem Oderbruch (6 – 5: 0,97). Diese clusterten zusammen, ebenso wie Oberes Rheintal und Mittleres Rheintal. Abgegrenzt von diesen vier befand sich die Population Unteres Rheintal (5 – 1: 5,37), die, obwohl sie aus den verschiedenen Wirtspflanzen Mais und Beifuss stammte, sich untereinander kaum unterschieden.

Tab. 4.5: Relative Längen des Dendrogramms zwischen den Gruppen berechnet nach Nei (1978)

zwischen	und	relative Länge
8	7	26,19
7	6	1,27
6	Bodensee	12,44
6	5	0,97
5	4	0,45
4	2	2,07
2	Oberes Rheintal	8,95
2	Mittleres Rheintal	8,95
4	3	1,47
3	Halle	9,55
3	Oderbruch	9,55
5	1	5,37
1	Unteres Rheintal (Beifuss)	6,10
1	Unteres Rheintal (Mais)	6,10
7	Spanien	13,70
8	<i>Plutella xylostella</i>	39,90

Zusätzlich zu den Berechnungen mit dem Computerprogramm Popgene, der sämtliche Individuen einer vorher definierten Gruppe (Standort/Wirtspflanze/Art) zur Analyse zusammenfaßt („poolen“), wurde die Auswertesoftware Treecon verwendet. Damit konnten die Ergebnisse über verschiedene numerische Verfahren als Stammbäume dargestellt werden.

1. Neighbour-Joining (Saitou & Nei 1987)

Das daraus gebildete Dendrogramm resultierend aus der AFLP-Matrix ist in Abb. 4.5 dargestellt. Vergleicht man dieses mit dem Popgene-Dendrogramm so zeigt sich auch hier wieder *P. xylostella* als am weitesten entfernte Gruppe. Die Unterschiede zwischen den Maiszünslern sind relativ klein. Die Individuen clustern nach ihren Herkünften zusammen, obwohl sie auf Individuenbasis einzeln berechnet wurden. Eine Vermischung von Individuen unterschiedlicher Populationen ist nicht zu beobachten. Die Paarbildung der beiden ostdeutschen Herkünfte erfolgte wie bei Popgene, ebenso clusterten die beiden Populationsrassen aus dem Unteren Rheintal zueinander, ließen sich aber trotzdem minimal voneinander nach Wirtspflanzen abgrenzen. Auch die Maiszünsler aus den Populationen

Oberes Rheintal und Mittleres Rheintal fanden sich wieder als Pärchen zusammen. Die Maiszünsler aus Spanien und aus der Region Bodensee clusterten geringfügig davon entfernt. Allerdings zeigten bei dieser Berechnung die beiden Populationsrassen aus dem Unteren Rheintal/Bonn die größte Distanz zu allen anderen Maiszünslerpopulationen.

2. UPGMA (Sneath & Sokal 1973)

Bei diesem Verfahren werden die einzelnen Individuen nach den arithmetischen Mitteln der genetischen Distanzen einer OTU miteinander kombiniert. Das entstandene Dendrogramm ist in Abb. 4.4 dargestellt. Bei dieser Berechnung der 0/1 AFLP-Matrix wurde dieselbe Methode verwendet, wie bei dem bereits beschriebenen Popgene-Dendrogramm (Abb. 4.3), nur wurden auch hier, wie bei dem Neighbour-Joining-Verfahren die Individuen einzeln ausgewertet und nicht wie beim Programm Popgene in den einzelnen Gruppen gepoolt.

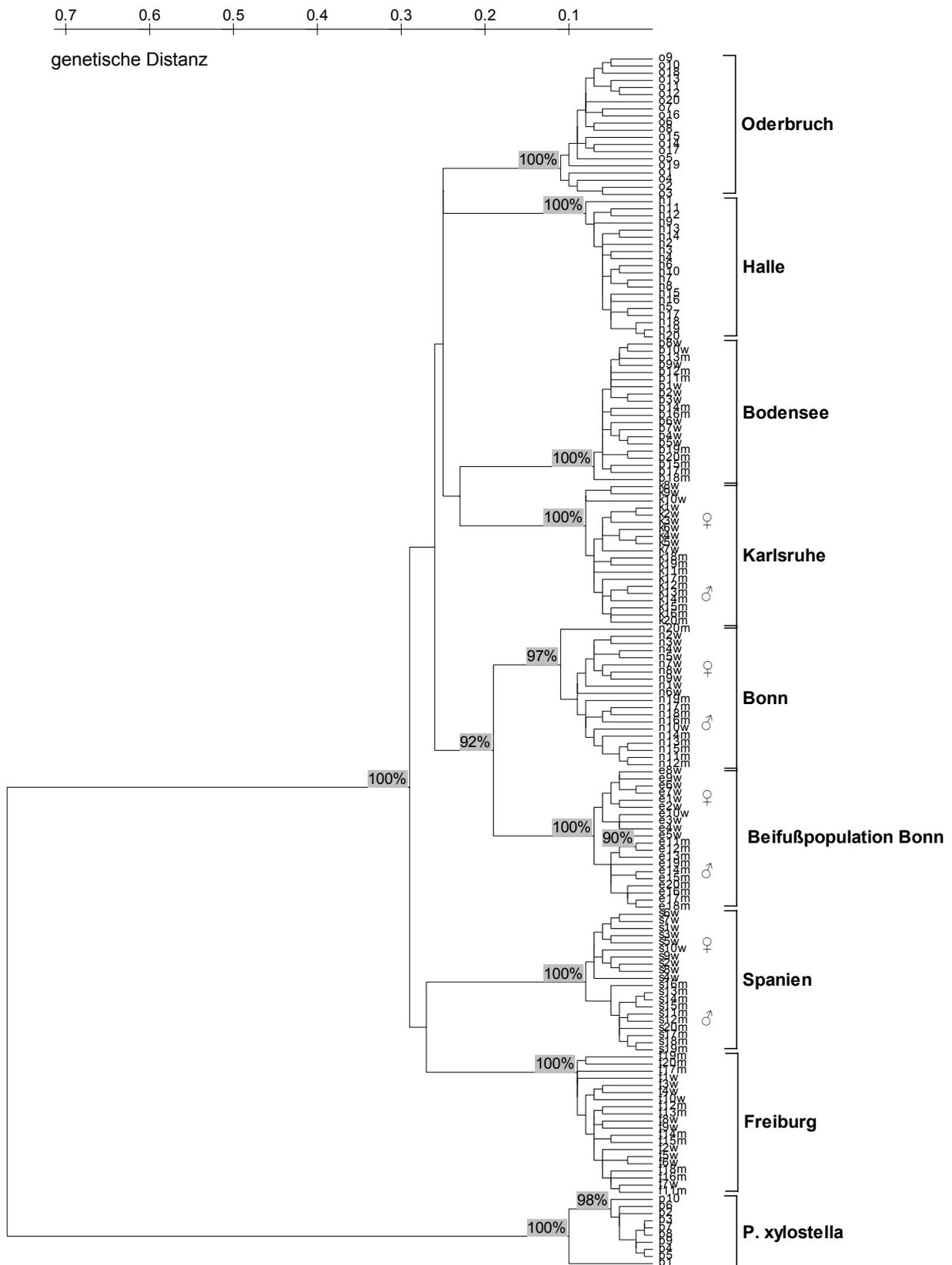


Abb. 4.4: AFLP-Dendrogramm der UPGMA-Analyse mit bootsrap-Werten (grau); ♀/♂-Symbole kennzeichnen eine Auftrennung in männliche und weibliche Tiere.

4.1.2 Genetische Charakterisierung mit Hilfe der RAPD-Methode

Zusätzlich zu der AFLP-Analyse wurden die Verwandtschaftsverhältnisse der verschiedenen Maiszünslerpopulationen mit der Methode der RAPD-PCR untersucht. In Abb. 4.6 sind als Beispiel zwei RAPD-Gele mit Primer D 7 abgebildet. Es handelte sich dabei um jeweils 10 männliche adulte Tiere der Maiszünslerpopulation Unteres Rheintal/Bonn (Maisrasse) (A), sowie von *Sesamia nonagrioides* (B).

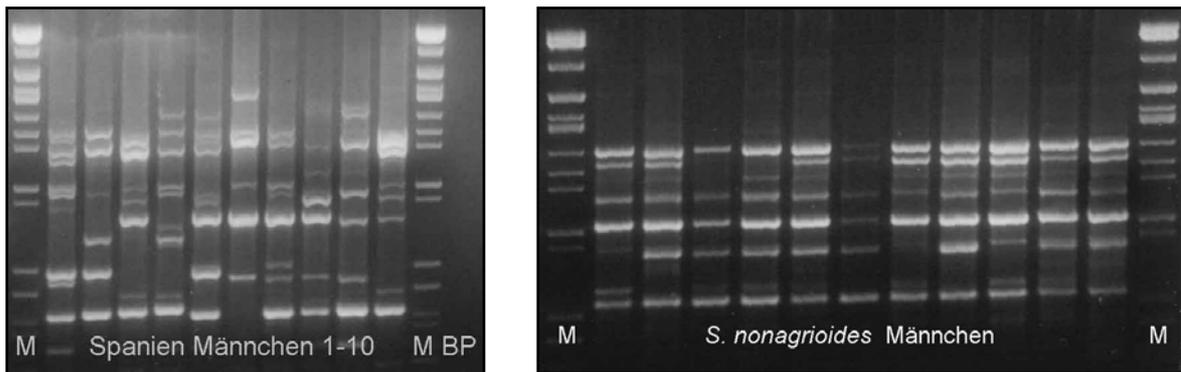


Abb. 4.6: RAPD-Gele mit Primer D 7 und jeweils 10 Männchen vom Standort Unteres Rheintal/Bonn Mais (A) und von *S. nonagrioides*. **M:** Größenmarker λ Eco 47/I , **BP:** Blindprobe.

Je nach eingesetztem RAPD-Primer ergaben sich unterschiedliche Bandenmuster durch die amplifizierten PCR-Fragmente. Die jeweilige Anzahl der für die Auswertung verwendeten Banden ist Tab. 4.6 zu entnehmen. Insgesamt wurden 62 verschiedene Banden ausgewertet.

Tab. 4.6: Anzahl der ausgewerteten Banden für jeden der acht Deca-Primer

RAPD-Primer	Anzahl ausgewerteter Banden pro Primer
D 3	9
D 7	9
D 21	7
D 28	7
D 29	5
A 9	9
A 10	8
A 12	8
Σ	62

4.1.2.1 Polymorphiegrad und Shannon-Index

Wie mit den Ergebnissen der AFLP-Untersuchungen wurde auch mit den RAPD-Ergebnissen der Polymorphiegrad über das Verhältnis monomorpher zu polymorpher Banden, sowie der Shannon-Index als Maß für genetische Diversität bestimmt. Tab. 4.6 gibt die Anzahl der insgesamt innerhalb einer Population gefundenen Banden, unterteilt in monomorphe und polymorphe Banden, an. Der Polymorphiegrad entspricht dem prozentualen Anteil polymorpher Banden. Die jeweiligen Polymorphiegrade wurden aus den Daten der 0/1-Matrix bestimmt. Die Polymorphiegrade liegen bei den untersuchten Maiszünslerpopulationen zwischen 79 % (Unteres Rheintal/Bonn, Mais) und 55% (Spanien). Abweichend davon beträgt der Polymorphiegrad bei dem mediterranen Maisbohrer (*Sesamia nonagrioides*) nur 18 % und erweist sich im Vergleich zu den Maiszünslerpopulationen als auffallend homogen.

Tab.4.7: Polymorphiegrad (PG) der untersuchten Populationen in %: Angegeben sind die Anzahl der monomorphen und polymorphen Banden sowie der Polymorphiegrad (PG) in %.

Population	Monomorphe Banden	Polymorphe Banden	PG (%)
Bodensee (B)	15	47	75,81
Oberes Rheintal/ Freiburg (F)	19	43	69,35
Mittleres Rheintal/ Karlsruhe (K)	22	40	64,25
Unteres Rheintal/ Bonn Mais (N)	13	49	79,03
Unteres Rheintal/ Bonn Beifuss (E)	19	43	69,35
Spanien (S)	28	34	54,84
<i>Sesamia nonagrioides</i> (Se)	51	11	17,74
Populationen gesamt (140)	167	267	61,52

Tab. 4.8: Genetische Diversität (Shannon-Index) auf Basis des RAPD-Fragmentmusters und die zugehörige Standardabweichung.

Population	Shannon Index	Standardabweichung
Bodensee (B)	0,3618	0,2600
Oberes Rheintal/ Freiburg (F)	0,3341	0,2701
Mittleres Rheintal/ Karlsruhe (K)	0,3056	0,2704
Unteres Rheintal/ Bonn Mais (N)	0,3865	0,2552
Unteres Rheintal/ Bonn Beifuss (E)	0,3593	0,2798
Spanien (S)	0,2963	0,2956
<i>Sesamia nonagrioides</i> (Se)	0,1030	0,2287

Bei der Betrachtung der genetischen Diversität fällt auf, dass der Shannon-Index bei allen Maiszünslerpopulationen dicht beieinander liegt. Die geringste Diversität mit einem Shannon-Index-Wert von 0,2963 findet sich innerhalb der spanischen Maiszünsler. Die höchste Diversität ist entsprechend dem höchsten Polymorphiegrad ebenfalls in der Maispopulation Unteres Rheintal/Bonn zu beobachten. Auch hier zeigt sich wieder der niedrige Shannon-Index von 0,1030 bei den Individuen von *S. nonagrioides*.

4.1.2.2 Genetische Ähnlichkeit und genetische Distanz

Die genetischen Ähnlichkeiten und die genetischen Distanzen der RAPD-Analyse der sechs untersuchten Maiszünslerpopulationen und von *S. nonagrioides* sind in Tab. 4.9 aufgeführt. Die genetischen Distanzen wurden anhand der Distanzmatrix ermittelt und errechnen sich nach den in Kap. 3.4.7 aufgeführten Formeln. Die genetischen Distanzen stellen die Mittelwerte aller Distanzen zwischen den Individuen zweier Populationen dar. Je kleiner ihr Wert, desto geringer ist entsprechend die Distanz zwischen den Populationen.

Tab. 4.9: RAPD-Analyse: Genetische Ähnlichkeiten (Werte über der Diagonalen) und genetische Distanzen (Werte unter der Diagonalen) der einzelnen Populationen nach Nei (1972)

	Karlsruhe K	Oberes Rheintal F	Bodensee B	Unteres Rheintal Beifuss	Spanien S	<i>Sesamia nonagrioides</i>	Unteres Rheintal Mais N
Mittleres Rheintal Karlsruhe K	****	0,9550	0,9382	0,8833	0,7965	0,6367	0,8608
Oberes Rheintal F	0,0461	****	0,9164	0,8608	0,7958	0,6358	0,8753
Bodensee B	0,0638	0,0873	****	0,8801	0,8133	0,6443	0,8579
Unteres Rheintal Beifuss E	0,1241	0,1499	0,1277	****	0,7602	0,6665	0,8654
Spanien S	0,2275	0,2284	0,2066	0,2742	****	0,5689	0,8031
<i>Sesamia nonagrioides</i> Se	0,4514	0,4529	0,4396	0,4057	0,5641	****	0,6976
Unteres Rheintal Mais N	0,1504	0,1331	0,1532	0,1446	0,2193	0,3601	****

Betrachtet man die Distanzen zwischen den Populationen, fällt der hohe Wert (0,41-0,56) zwischen *Sesamia nonagrioides* und den Maiszünslerpopulationen auf. Beim Vergleich der Maiszünslerpopulationen untereinander, zeigt sich die geringste genetische Distanz mit einem Wert von 0,05 zwischen Karlsruhe (Mittleres Rheintal) und der Population Oberes Rheintal/Freiburg. Ebenfalls nur ein geringer Abstand ist zwischen den Populationen Karlsruhe (Mittleres Rheintal) und Bodensee zu beobachten (0,06), sowie zwischen den Populationen Bodensee und Oberes Rheintal/Freiburg. Die größte genetische Distanz und damit den längsten Abstand voneinander haben erwartungsgemäß die deutschen Maiszünslerpopulationen von der spanischen Population (Spanien-Bodensee: 0,2066 – Spanien-Bonn/Beifuss: 0,2742). Vergleicht man nur deutsche Populationen untereinander, zeigt sich der größte Abstand (0,15329) zwischen den Maiszünslern vom Bodensee und denen aus der Region Unteres Rheintal/Bonn aus Mais. Der Mittelwert der genetischen Ähnlichkeit liegt bei 0,8575 ($\pm 0,014$) für alle Maiszünslerpopulationen, die genetische Ähnlichkeit der untersuchten deutschen Maiszünslerpopulationen beträgt als Mittelwert 0,8893 ($\pm 0,011$).

Um die genetischen Distanzen zwischen den einzelnen Populationen besser erkennen zu können, wurden sie, wie bei der AFLP-Analyse, mit Hilfe von verschiedenen Cluster-Methoden graphisch dargestellt. Die dazu verwendeten Dendrogramme (Stammbäume) basieren auf der 0/1-Matrix der untersuchten 140 Individuen. Diese Matrix bildet die Grundlage der mathematischen Analyse. Die numerischen Verfahren zur Bildung von Gruppen, den sogenannten Clustern, basieren auf unterschiedlichen Methoden, die bei der

Auswertung der AFLP-Untersuchungen bereits näher erläutert wurden. Wie bei den AFLP-Daten ist auch die RAPD-Datenmatrix dem Anhang zu entnehmen. Bei diesen numerischen Auswerteverfahren kann grundsätzlich unterschieden werden zwischen einer Darstellung auf Populationsebene, wobei die Daten der Einzelindividuen in ihren jeweiligen Populationen zusammengefasst berechnet werden („poolen“) oder einer Darstellung auf Individuenbasis. In Abb. 4.7 ist ein Dendrogramm berechnet auf Populationsbasis mit gepoolten Individuendaten, berechnet nach der UPGMA-Methode, dargestellt.

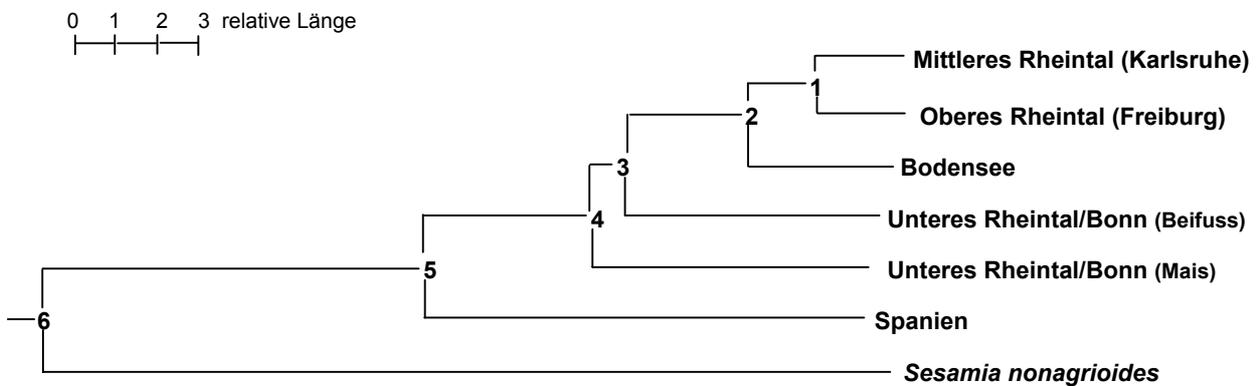


Abb. 4.7: RAPD-Analyse: Dendrogramm nach der UPGMA-Methode basierend auf den genetischen Distanzen nach Nei (1978) unter Verwendung des Computerprogramms Poppene. Die waagerechten Linien verdeutlichen maßstabsgetreu die genetischen Distanzen aus Tab. 4.10.

Bei der Betrachtung dieses Populationsstammbaumes fällt zunächst einmal *Sesamia nonagrioides* als „outgroup“ auf, die von allen Maiszünslerpopulationen am weitesten entfernt ist. Dies zeigen auch die Werte der relativen Distanzen des Dendrogramms, die in Tab. 4.10 aufgelistet sind. Mit einem Wert von 22,68 ist *S. nonagrioides* erwartungsgemäß weit von den Maiszünslerpopulationen entfernt. Ebenfalls wie erwartet, distanzieren sich die spanischen Maiszünsler von den übrigen deutschen Populationen (11,56). Weiterhin ist zu beobachten, dass die beiden südlichen Rheintalpopulationen Karlsruhe und Freiburg zusammenclustern und mit einem Wert von 2,30 vergleichsweise nah beieinander liegen. Ebenfalls nah zu diesem Paar findet sich auch die Bodensee-Population (3,78). Etwas abgegrenzt von diesen süddeutschen Maiszünslern liegen die beiden Bonner-Populationen, wobei überraschenderweise die Beifußpopulation näher 6,69 bei diesen zu finden ist als die Bonner Maispopulation (7,27).

Tab.: 4.10: Relative Distanzen des Dendrogramms zwischen den einzelnen Populationen/Gruppen berechnet nach Nei (1978)

zwischen	und	relative Länge
6	5	10,73
5	4	4,29
4	3	0,57
3	2	2,92
2	1	1,48
1	Karlsruhe	2,30
1	Freiburg	2,30
2	Bodensee	3,78
3	Bonn / Beifuß	6,69
4	Bonn / Mais	7,27
5	Spanien	11,56
6	<i>S. nonagrioides</i>	22,28

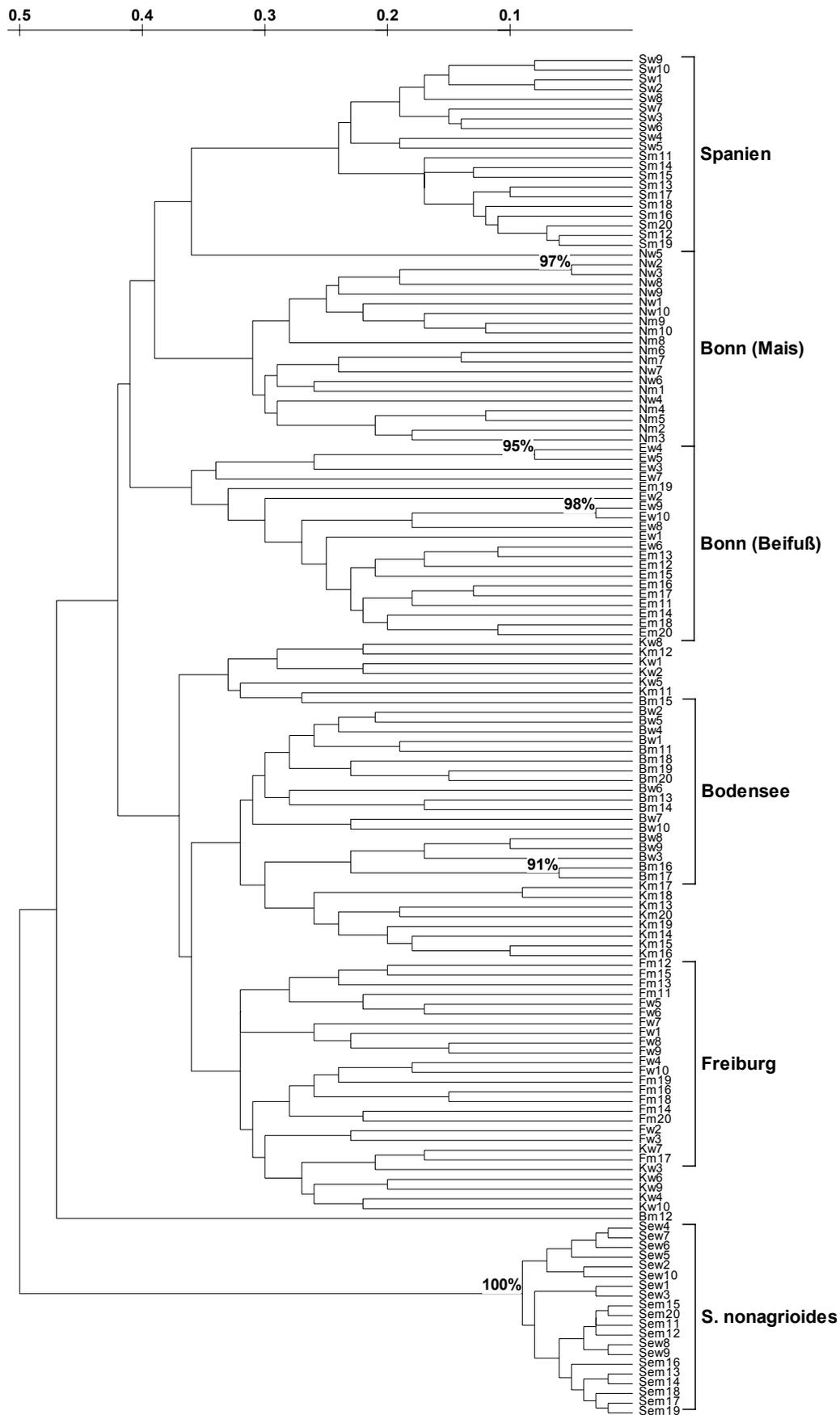


Abb. 4.8: Dendrogramm vom Typ UPGMA der RAPD-Analyse mit bootstrap-Werten in %

Bei dem in Abb. 4.8 dargestellten Dendrogramm wurden die genetischen Distanzen auf Individuenbasis berechnet, die Einzelwerte wurden also nicht wie beim Populationsdiagramm in Abb. 4.7 gepoolt, also zusammengefasst. Auch dieses Dendrogramm basiert auf der UPGMA-Methode, wurde aber mit Hilfe des Computerprogramms Treecon erstellt. Ein Ablesen der genetischen Distanzen wird in diesem Dendrogramm-Typ über die horizontalen Strecken ermöglicht. Im Vergleich mit dem auf dem selben Auswerteverfahren basierenden Populationsdendrogramm fällt auf, dass auch hier die „outgroup“ *S. nonagrioides* wie erwartet am weitesten von den Maiszünslerpopulationen isoliert ist. Auch die südwestdeutschen Populationen Bodensee, Freiburg und Karlsruhe finden sich nah beieinander und von den restlichen Populationen separiert wieder. Eine deutliche Abgrenzung der Karlsruher Individuen ist mit dieser Methode nicht möglich, sie finden sich innerhalb der beiden anderen Populationen verteilt wieder, was die geringen Unterschiede dieser drei Populationen verdeutlicht. Da im Gegensatz zu anderen numerischen Verfahren bei der UPGMA, der ungewichteten Analyse, der Einfluss von Ausreißern nicht abgemildert wird, zeigt sich isoliert von den übrigen Individuen, das Einzeltier Bonn männlich 12 als sogenannter Ausreißer in diesem Stammbaum. Die übrigen Populationen (S, N, E) lassen sich dagegen wieder eindeutig als distinkte Gruppen voneinander abgrenzen. Auffällig ist hier nur die Zuordnung der spanischen Maiszünsler zu den beiden Bonner Populationen, besonders Bonn Mais (N). Zusätzlich lässt sich in dieser Darstellung bei der spanischen Population, sowie bei *S. nonagrioides* eine Abgrenzung der männlichen von den weiblichen Tieren feststellen.

Ein ähnliches Bild zeigt das zweite hier angewandte Verfahren, das Neighbour-Joining. Dieses Verfahren wird hauptsächlich zur Darstellung phylogenetischer Zusammenhänge verwendet. Hier wurden ebenfalls die Individuen einzeln berechnet und dargestellt. Abb. 4.9 zeigt den daraus resultierenden Stammbaum.

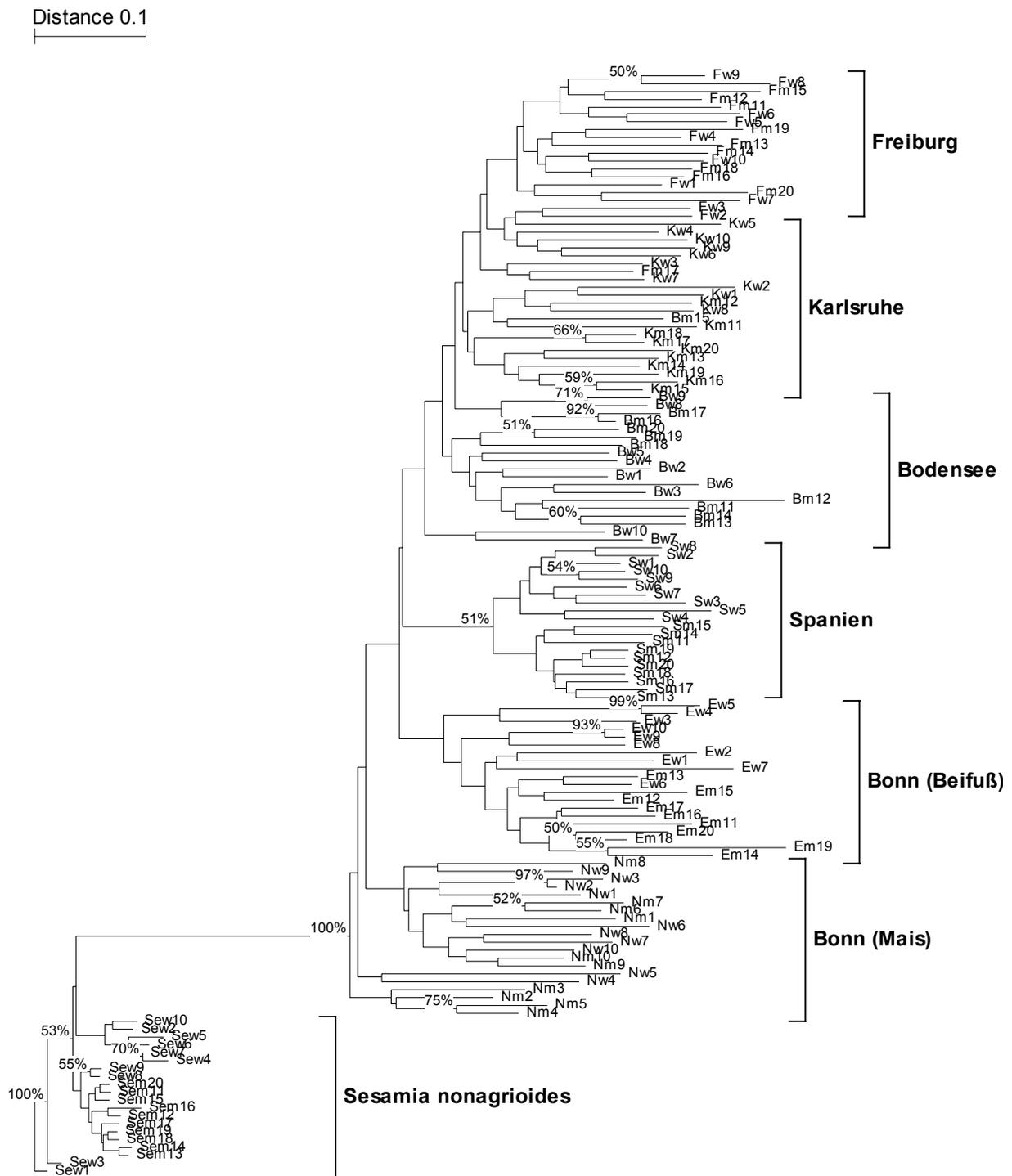


Abb. 4.9: RAPD-Dendrogramm nach der Neighbour-Joining-Methode mit bootstrap-Werten in %

4.2 Toxizitätstest

Nach Optimierung der Testmethode, wurden insgesamt 125 Basissuszeptibilitätstests durchgeführt und dabei 36 000 Maiszünslerlarven getestet. Verglichen wurden zwei verschiedene Testmethoden: die Untermischmethode und die Oberflächenapplikation (siehe Kap. 3.5). Mit diesen beiden Methoden wurden Larven von vier verschiedenen Sammelstandorten getestet: oberes Rheintal (F), mittleres Rheintal (K), unteres Rheintal (N) und die Region nördlicher Bodensee (B).

Weiterhin kamen Toxine unterschiedlicher Herstellung zum Einsatz: ein Protoxin (Cry1Ab), zwei verkürzte Toxine (Cry1Ab) und ein kommerziell hergestellte Toxinlösung (Cry1Ac). Die genaue Charakterisierung der einzelnen Toxine ist Kap. 3.51 (Tab. 3.25) zu entnehmen.

4.2.1 Untermischmethode

In Tab. 4.11 sind die LC_{50} Mittelwerte der Einzeltests der vier Populationen getestet mit den beiden verkürzten (truncated) Cry1Ab Toxinen (Firma Monsanto und SLFA Neustadt) mit der Untermischmethode aufgelistet. Betrachtet man die Werte des Monsanto-Toxins zeigten sie nur einen Unterschied in der Suszeptibilität im Gebiet Unteres Rheintal/Bonn (Mais) (LC_{50} : 0,41 $\mu\text{g/g}$). Bei allen anderen Populationen ist der LC_{50} mit 0,12 $\mu\text{g/g}$ identisch. Die Ergebnisse mit dem zweiten verkürzten Toxin (Neustadt-Toxin) zeigten dagegen eine höhere Variabilität. Auch hier wich der LC_{50} Wert der Population Unteres Rheintal (2,42 $\mu\text{g/g}$) geringfügig, aber nicht signifikant, von den anderen Werten ab, die nur wenig zwischen 1,55 – 1,73 $\mu\text{g/g}$ schwankten. Im Vergleich zum Monsanto Toxin war die Empfindlichkeit der Larven gegenüber dem Neustadt-Toxin deutlich schwächer.

Tab. 4.11: Probit-Analyse zur Mortalität von Maiszünslern verschiedener Regionen gegenüber zwei verkürzten Cry1Ab-Toxinen von verschiedenen Herstellern, gemittelte LC_{50} -Werte mit Standardfehler (SE) der einzelnen Populationen, getestet unter Verwendung der Untermischmethode. Varianzanalyse: Monsanto Toxin: $F=9,41$, $n=49$, $p<0,001$; Neustadt Toxin $F=23,4$ $n=35$, $p<0,001$. Mittelwertvergleich mit Scheffe Test. Gleiche Buchstaben kennzeichnen homogene Gruppen.

Untermischmethode	Cry1Ab truncated (Monsanto)			Cry1Ab truncated (Neustadt)		
	Mittelwert LC_{50} in $\mu\text{g/g}$ Medium	SE	Test- anzahl	Mittelwert LC_{50} in $\mu\text{g/g}$ Medium	SE	Test- anzahl
Bodensee B	0,12 a	0,02	10	1,73 a	0,05	6
oberes Rheintal F	0,12 a	0,03	10	1,55 a	0,27	6
mittleres Rheintal K	0,12 a	0,02	10	1,57 a	0,27	6
unteres Rheintal N	0,41 b	0,05	10	2,42 a	0,64	6

Die Tab.4.12 zeigt die Werte der vier Populationen getestet mit dem Toxin der Firma Monsanto nach Durchführung einer erweiterten statistischen Auswertung. Hier wurden die Daten aus allen Tests zusammengefasst und gemeinsam in einer Probitanalyse unterworfen. Wie in Tab. 4.11 sind die LC_{50} Werte dargestellt, aber mit dem jeweiligen Konfidenzintervall (CL), mit der Steigung der Tangente der Probitkurve am Punkt des LC_{50} und dessen Standardfehler und dem Ergebnis des χ^2 -Anpassungstests. Vorteil dieser Auswertemethode ist, dass man zu den LC_{50} Werten zusätzlich eine Reihe von Parametern erhält, die die Qualität des LC_{50} beschreiben. Der Vergleich beider Methoden führte zu ähnlichen LC_{50} Werten, die sich nur in der zweiten Stelle hinter dem Komma unterschieden. Der Vergleich der Steigungen und des χ^2 -Anpassungstests zeigten, dass der Verlauf der sigmoiden Kurve des Probitmodells in allen Versuchen sehr ähnlich war und damit die Werte gut vergleichbar waren bzw. das berechnete Probitmodell gut an die ermittelten Datenpunkte angepasst war.

Tab. 4.12: Ergebnisse der Probit-Analyse zur Mortalität von Maiszünslern mit untergemischtem Monsanto-Toxin (truncated). Angegeben sind LC_{50} und LC_{90} Werte mit ihrem 95 % Koinfidenzintervall, Steigung des Probitmodell am Punkt LC_{50} , sowie das Ergebnis des χ^2 -Anpassungstests.

Standort	n	LC_{50} (95%CL)	LC_{90} (95%CL)	Steigung \pm SE	χ^2
Bodensee B	2880	0,10 (0,06-0,14)	0,92 (0,56-1,88)	1,30 \pm 0,98	0,09
oberes Rheintal F	2880	0,10 (0,05-0,16)	1,84 (0,89-6,14)	1,00 \pm 0,74	0,09
mittleres Rheintal K	2880	0,11 (0,09-0,13)	0,93 (0,70-1,31)	1,35 \pm 0,96	0,03
unteres Rheintal N	2880	0,34 (0,21-0,54)	4,45 (2,31-12,44)	1,15 \pm 0,62	0,15

Weiterhin sollte überprüft werden, ob sich Maiszünsler, die für mehrere Generationen im Labor gezüchtet wurden von Freiland-Maiszünslern hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber Bt-Toxinen unterscheiden. Dafür wurden Larven aus der Labordauerzucht im

Vergleich zu Larven aus neu gesammelten Eigelegen getestet. In beiden Fällen handelte es sich um Tiere, die aus der Region des Oberen Rheintals stammten. Die Larven aus der Laborzucht befanden sich (je nach Testwiederholung) in der 9.-11. Laborgeneration. Die Larven aus dem Freiland stammten aus der F1-Generation, die aus im Jahr 2001 gesammelten Eigelegen gezüchtet wurden. Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden für beide Testreihen die Untermischmethode mit demselben Toxin (Monsanto) verwendet. Die Ergebnisse, dargestellt in Tab. 4.13, zeigten, dass die LC_{50} -Werte ($0,12 \mu\text{g/g}$) zwischen Laborgeneration und Freilandlarven nicht voneinander abwichen (t-Test: $t = 0,55$, $p = 0,957$).

Tab. 4.13: Vergleich der Mittelwerte der LC_{50} gegenüber verkürztem Cry1Ab-Toxin von Monsanto zwischen einer Freilandpopulation und einer Laborzucht derselben Herkunft. Angegeben ist der Standardfehler (SE) und die Anzahl der durchgeführten Tests.

Untermischmethode	Cry1Ab truncated (Monsanto)		
	Mittelwert LC_{50} in $\mu\text{g/g}$ Medium	SE	Testanzahl
Standort: Oberes Rheintal F			
Freiland F*	0,12	0,01	4
Laborzucht F_L (9.-11. Laborgeneration)	0,12	0,03	10

Ebenfalls mit der Untermischmethode wurden Suszeptibilitätstests mit nicht verkürztem Protoxin (zur Verfügung gestellt von der Firma Novartis, jetzt Syngenta) durchgeführt. Die LC_{50} -Ergebnisse, als Mittelwerte der jeweiligen Einzeltest LC_{50} -Werte sind in Tab. 4.14 aufgeführt, zusammen mit den Ergebnissen der Testreihe mit kommerziellem Pflanzenschutzmittel MVP II (Firma Dow Agrosience), das Cry1Ac als insektiziden Wirkstoff enthielt. Hiermit sollte das Suszeptibilitätsniveau gegenüber einem konventionellen Bt-Präparat bestimmt werden und ein Vergleich zwischen den eingesetzten Testtoxinen und käuflichen Präparaten ermöglicht werden. Zusätzlich konnten die hier erzielten Daten mit Literaturwerten verglichen werden, in deren Untersuchungen ebenfalls MVP-Toxin verwendet wurde (Marcon et al. 1999b).

Tab. 4.14: Vergleich der Toxizitätswerte eines Protoxins mit einem kommerziellen Cry1Ac Produkt. Angegeben sind Mittelwerte der LC_{50} -Tests (Untermischmethode) mit Angabe des Standardfehlers (SE) und der Anzahl durchgeführter Testwiederholungen. Varianzanalyse Protoxin: $F = 2,73$, $n = 20$, $p = 0,07$; MVP II t-Test $t = 1,13$, $n = 16$, $p = 0,279$. n.d. nicht durchgeführt.

Untermischmethode	Cry1Ab Protoxin			Cry1Ac MVP II		
	Mittelwert LC ₅₀ in µg/g Medium	SE	Test- anzahl	Mittelwert LC ₅₀ in µg/g Medium	SE	Test- anzahl
Bodensee B	1,02	0,16	4	0,33	0,09	8
Oberes Rheintal F	1,15	0,35	4	n.d.		
Mittleres Rheintal K	0,82	0,09	5	0,22	0,03	8

Da das Protoxin nur in geringen Mengen zur Verfügung standen, konnten nur zwischen 4 und 7 Testwiederholungen durchgeführt werden und nicht alle zur Verfügung stehenden Maiszünslerpopulationen getestet werden. Bei Betrachtung der Protoxin-Suszeptibilität der drei Populationen, zeigte sich im Vergleich zu den Werten der beiden verkürzten Toxine eine höhere Variabilität. Die LC₅₀-Werte (0,82 – 1,15 µg/g) lagen mit einem Mittelwert von 1,0 µg/g deutlich über denen des verkürzten Monsanto-Toxin, die einen Mittelwert von 0,19 µg/g aufwiesen. Obwohl es sich um Protoxin handelte, das erst noch aufgespalten werden musste, ist die Empfindlichkeit gegenüber dem Protoxin geringer, als bei Tests mit dem verkürzten Neustadt-Toxin (gemittelter LC₅₀ Wert aller Populationen 1,82 µg/g).

4.2.2 Oberflächenapplikation

Tab. 4.15 zeigt die LC₅₀-Werte der beiden verkürzten Cry1Ab-Toxine, ermittelt mit der Testmethode der Oberflächenapplikation. Hier sollte im Vordergrund das Neustadt-Toxin getestet werden, um die erzielten Ergebnisse mit denen der BBA-Gruppe vergleichen zu können. Im Gegensatz zur Untermischmethode wurden die Ergebnisse bei der Oberflächenapplikation nicht in µg/g sondern in ng/cm² angegeben. Die LC₅₀-Werte lagen zwischen 16,50 ng/cm² (Bodensee) und 35,14 ng/cm² (Population Oberes Rheintal), wobei hier anders als bei der Untermischmethode die Larven aus der Region Unteres Rheintal nicht den höchsten Wert, also die geringste Empfindlichkeit, zeigten.

Tab. 4.15: Vergleich der gemittelten LC_{50} Wert (ng/cm^2) von zwei verschiedenen verkürzten (truncated) Bt-Toxinen (Oberflächenapplikation) für die verschiedenen Maiszünsler-Populationen. Angegeben sind Standardfehler (SE) und Testanzahl. Varianzanalyse Cry1Ab (Neustadt): $F=4,7$, $n=20$, $p=0,015$. Mittelwertvergleich mit Scheffe Test. Gleiche Buchstaben kennzeichnen homogene Gruppen. n.d. nicht durchgeführt.

Oberflächenapplikation	Cry1Ab truncated (Monsanto)			Cry1Ab truncated (Neustadt)		
	Mittelwert LC_{50} in ng/cm^2	SE	Test- anzahl	Mittelwert LC_{50} in ng/cm^2	SE	Test- anzahl
Bodensee B	n.d.			16,50 a	0,92	5
oberes Rheintal F	3,62	0,64	5	35,14 b	4,73	5
mittleres Rheintal K	n.d.			23,95 ab	3,82	5
unteres Rheintal N	n.d.			28,70 ab	3,42	5

Um einen Vergleich zum Monsanto-Toxin zu bekommen und einen Faktor zwischen den beiden Toxinen ermitteln zu können, wurde noch zusätzlich eine Population mit dem Monsanto-Toxin nach dieser Methode getestet (Tab. 4.15). Der LC_{50} -Wert liegt mit $3,62 ng/cm^2$ um den Faktor 7 unter den Werten, die mit dem Neustadt-Toxin ermittelt werden konnten.

Vergleicht man die Untermischmethode mit der Oberflächenapplikation unterscheiden sich bei den zwei Methoden die beiden verkürzten Toxine erheblich voneinander. Der Faktor zwischen Monsanto und Neustadt-Toxin ist mit 9,5 bei der Untermischmethode sogar noch höher als bei der Methode der Oberflächenapplikation (Faktor 7). In beiden Fällen reagieren die Larven auf das Monsanto-Toxin mit einer erhöhten Empfindlichkeit.

4.3 Selektion auf toxinhaltigem Futter

Die überlebenden Larven der höchsten drei Toxinkonzentrationen aus den Suszeptibilitätstests wurden gesondert gesammelt und weitergezüchtet (TOX). Ihnen und ihren Nachkommen wurde Futter mit untergemischtem, verkürztem (truncated) Toxin (Firma Monsanto) gegeben. Die verabreichte Toxinkonzentration von $0,03 \mu g/g$ Nährmedium richtete sich zunächst nach dem LC_{20} der vorangegangenen Untermisch-Tests mit Monsanto-Toxin. Dieser Wert wurde nach 6 Generationen auf $0,055 \mu g/g$ erhöht und nach weiteren sechs Generationen auf $0,1 \mu g/g$ angehoben. Nach der 9. Generation wurde begonnen Suszeptibilitätstests mit Monsanto-Toxin nach der Untermischmethode durchzuführen, um eine mögliche Veränderung in der Basisempfindlichkeit festzustellen.

Nach weiteren neun Generationen Selektion wurden wiederum der LC 50 festgestellt. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Tab. 4.16 aufgelistet.

Tab.4.16: LC₅₀ Werte der mit Bt-Toxin-haltigem Futter selektionierten Maiszünsler mit Standardfehler (SE) und Anzahl der durchgeführten Testwiederholungen. Im Vergleich dazu die Werte eines Standorts (K) desselben Ursprungs ohne Selektionierung. t-Test: $t=6,77$, $n=17$, $p<0,001$.

Untermischmethode	Cry1Ab truncated (Monsanto)		
	Mittelwert LC ₅₀ in µg/g Medium	SE	Testanzahl
Rheintal TOX (Selektion)			
Generation 9-11	1,05	0,15	7
Generation 18-20	1,00	0,08	3
Mittleres Rheintal K	0,12	0,02	10

Anhand der Werte lässt sich deutlich erkennen, dass die Empfindlichkeit gegenüber Cry1Ab-Toxin bei den Maiszünslern unter Selektionsdruck abnahm, sie also entsprechend höhere Konzentrationen von Bt-Toxin tolerieren konnten als die Tiere, die keinem Selektionsdruck ausgesetzt waren. Um festzustellen, ob es sich bei der gezeigten Änderung in der Suszeptibilität um eine beginnende Resistenzentwicklung handelte, wurde ein Test mit Bt-Maispflanzen durchgeführt.

Parallel zum Pflanzentest wurden entsprechende Larven in Petrischalen auf transgene und isogene Maisblätter gesetzt. Dabei zeigte sich, dass trotz der erfolgten Selektionierung der TOX-Maiszünsler alle Larven auf Bt-Mais innerhalb von 5 Tage starben, während die Mortalitätsrate der Kontrolle (ohne Bt-Toxin) mit 10 % deutlich darunter lag (Fisher Exact Test: $\chi^2 = 81,82$; $p < 0,001$). Das Gesamtergebnis zeigte, dass die Larven durch den Selektionsdruck eine gewisse Toleranz gegenüber dem Bt-Toxin entwickelt hatten, eine Resistenz gegenüber der expremierten Toxinkonzentration in den Maisblättern allerdings noch nicht vorlag.

4.4 DNA-Nachweis von gentechnisch verändertem Mais

Um Sicherzustellen, dass die in der Bt-Parzelle gefundenen Maiszünslerlarven auch in gentechnisch verändertem Mais vorkamen, wurden Blattproben und Kolbenstücke von vier befallenen Pflanzen auf das Vorhandensein des Bt-Gens im Genom untersucht.

Dabei zeigte sich, dass in allen vier Maisblattproben aus der Bt-Parzelle ein 401 Basenpaar großes Amplifikationsprodukt gebildet wurde. Dies zeigte, dass es sich um transgene Pflanzen (Event MON 810) handelte, da die beiden Primer so gewählt wurden, dass nur bei Vorhandensein des eingebrachten Promotors und eines maisspezifischen Hitzeschockproteingens ein positives Ergebnis erreicht wird (siehe Kap. 3.7). Das Ergebnis der PCR ist in Abb. 4.10 dargestellt.

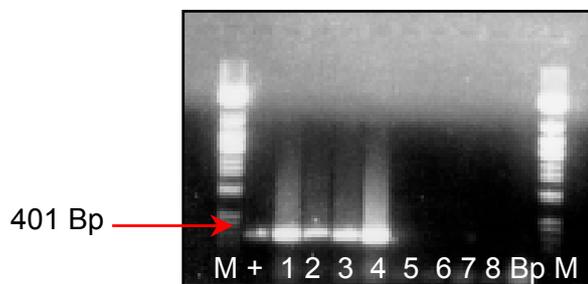


Abb. 4.10: PCR Reaktion mit DNA aus Maisblättern. Proben 1-4: Maispflanzen mit Zünslerbefall aus der Bt-Variante; Proben 5-8: Maispflanzen aus nicht transgener (isogener) Anbauvariante; **+**: Positivkontrolle (MON 810); **Bp**: Blindprobe (Wasser); **M**: Marker (λ -DNA Eco 47/I).

Die Blattproben befallener Pflanzen aus der nicht transgenen Anbauvariante, die als Negativproben dienten, erzielten bei der PCR kein Amplifikationsprodukt. Bei der Positivkontrolle handelte es sich um eine Blattprobe einer im Gewächshaus aufgezogenen Bt-Pflanze der Firma Monsanto (Event MON 810), bei der vorher durch einen Biotest mit Maiszünslerlarven die Expression des Bt-Toxingens nachgewiesen werden konnte. Diese Kontrolle bildete ein 401 Basenpaar großes PCR-Produkt, von derselben Größe, wie die PCR-Fragmente der Feldproben. Die Blindprobe, bei der an Stelle von DNA Wasser eingesetzt wurde, zeigte keine Bande.

Um zu überprüfen, ob derselbe Bt-Nachweis aus Maiskolben ohne Protokolländerungen möglich ist, wurde eine weitere PCR angesetzt. Die zweite PCR wurde mit DNA durchgeführt, die aus den Kolbenproben der Maispflanzen vom Versuchsfeld isoliert wurde. Es wurden von derselben Pflanze jeweils zwei Kolbenproben eingesetzt. Als Negativ- und

Positivkontrollen mussten Blattproben genommen werden, da die Kontrollpflanzen im Gewächshaus keine Kolben angesetzt hatten.

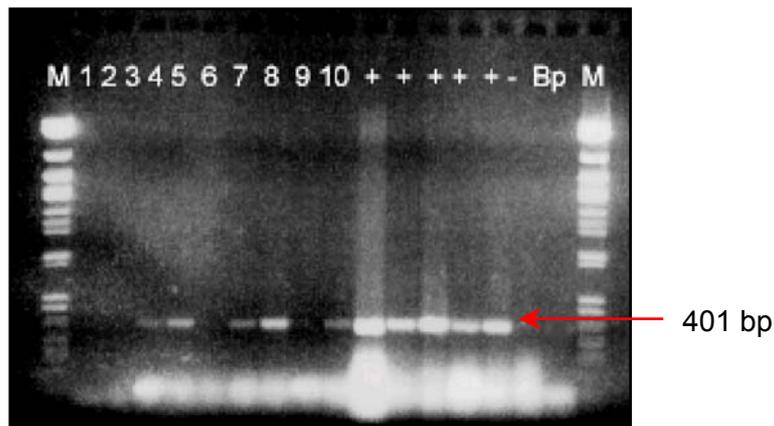


Abb. 4.11: PCR von Kolbenproben der Maispflanzen des Versuchsfeldes. Proben 1 + 2: Maiskolben der nicht transgenen Anbauvariante, 3-10: Maiskolben-DNA der vier befallenen Pflanzen der Bt-Variante (Doppelansatz), +: Positivkontrollen aus Blattproben verschiedener transgener Pflanzen (MON 810) aus dem Gewächshaus, -: Negativkontrolle: isogene, nicht transgene Maissorte aus dem Gewächshaus (Blattprobe), **Bp**: Blindprobe (Wasser); **M**: Marker (λ -DNA Eco 47/I)

Das Ergebnis zeigte in allen Proben der vier untersuchten Pflanzen aus der Bt-Variante einen positiven Nachweis des Bt-Gens. Das bedeutet, dass diese Pflanzen trotz Fraßspuren des Maiszünslers eindeutig transgen sind. Dies bestätigte auch der PCR-Nachweis aus den dazugehörigen Kolbenproben, bei denen das Bt-Konstrukt in mindestens einem der Doppelansätze nachzuweisen war (Abb. 4.11), allerdings im Vergleich zur Positivkontrolle aus Blattmaterial in deutlich geringerer Menge.

4.5 Untersuchung auf Mikrosporidien

Um einen Befall der Maiszünslar der Laborzuchten mit Mikrosporidien mit Hilfe molekularbiologischer Methoden diagnostizieren zu können, wurde eine PCR mit DNA von Maiszünslarlarven aus der Zucht (Abb. 4.12: Proben 1-12) durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde die Teilprobe einer von der BBA Darmstadt mit histologischen Methoden positiv diagnostizierte Larve (Standort Mittleres Rheintal/Karlsruhe) verwendet. Die Negativkontrolle war entsprechend die histologische Teilprobe einer Larve mit negativem Befund.

Wie in Abb. 4.12 zu erkennen ist, zeigten jeweils die Probe 4 (Mittleres Rheintal/Karlsruhe) und 12 (Bodensee) eine Bande der erwarteten Größe. Verglichen mit der Positivkontrolle

kann von einem positiven Nachweis von Mikrosporidien-DNA in diesen beiden Larvenproben ausgegangen werden. Die Negativkontrolle, sowie die Blindprobe wiesen erwartungsgemäß keine Banden dieser Größenordnung auf.

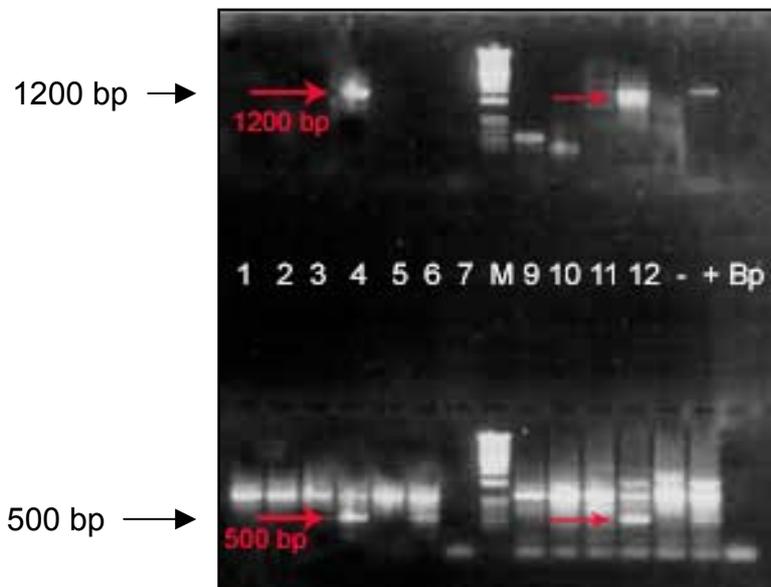


Abb. 4.12: PCR-Nachweis auf Mikrosporidienbefall (oben) von Maiszünsler-DNA und spezifischer Nachweis der Gattung *Nosema* (unten). DNA von Maiszünslerlarven aus der Zucht: 1-6 Standort Karlsruhe, 9-12 Standort Bodensee, -: Negativkontrolle, +: Positivkontrolle, **Bp**: Blindprobe, **M**: Marker-DNA (ladder λ Eco 47/I). Die roten Pfeile kennzeichnen die spezifischen Amplifikationsprodukte der verwendeten Primer.

Die Untersuchung zeigte, dass einzelne Tiere in der Zucht von Mikrosporidien befallen waren (je 1 von 6). Ein zweiter PCR-Ansatz bestätigte, dass es sich bei den nachgewiesenen Mikrosporidien um die Gattung *Nosema* handelte, die hauptsächlich den Maiszünsler befällt.

5. Diskussion

5.1 Populationsgenetische Differenzierung des Maiszünslers

Mit Hilfe von zwei molekularbiologischen DNA-Fingerprint-Methoden, AFLPs und RAPDs, konnten Rückschlüsse auf die genetische Diversität und die Differenzierung verschiedener Maiszünslerpopulationen gezogen werden. Solche populationsgenetischen Daten können dazu verwendet werden, geographische Populationsstrukturen zu erkennen und Populationen voneinander abzugrenzen (Fitt et al. 2003).

Die Ergebnisse der AFLP-Analysen geben Hinweise auf die verwandtschaftlichen Beziehungen der verschiedenen untersuchten Populationen. Alle neun verwendeten Primerkombinationen lieferten ausreichend auswertbare Banden. Die Bandenanzahl lag je nach Primerpaar zwischen 21 und 40 Banden und befindet sich damit innerhalb der bei dieser Methode erwarteten Größenordnung. Baker (2000) gibt an, dass durchschnittlich 20-40 verwendbare loci pro AFLP-Gel erreicht werden. Die Reproduzierbarkeit der AFLP-Reaktionen war hoch, dasselbe Bandenmuster konnte bei allen Wiederholungen bestätigt werden, was die Zuverlässigkeit dieser Methode belegt. Die hohe Reproduzierbarkeit bei AFLP-Analysen wird auch in anderen Untersuchungen bestätigt (Vos et al. 1995, Ajmone-Marsan et al. 1997, Jones et al. 1997, Baker 2000, Hawthorne 2001). Verglichen mit deren AFLP-Untersuchungen war der Einsatz von neun Primerkombinationen vergleichsweise hoch. Campbell et al. (2003) zeigten, dass schon die Verwendung nur einer Primerkombination eine Zuordnung verschiedener Populationen möglich macht. Andere Untersuchungen zur genetischen Diversität erfolgten mit 3-5 AFLP-Primerkombinationen (Sharma et al. 2000, Cresswell et al. 2001, Ubi et al. 2001, Gilbert et al. 2002) und die erzielten Ergebnisse ermöglichten zwischen Populationen zu unterscheiden. Die unterschiedlichen Bandenmuster der einzelnen AFLP-Gele ergeben sich durch die Genomkomplexität der untersuchten Individuen, dem GC-Gehalt der genomischen DNA und den selektiven Nukleotiden der verwendeten Primer (Lin et al. 1999). Distinkte Populationen sollten erwartungsgemäß Unterschiede in der Anzahl vorhandener polymorpher Banden zeigen. Diese Unterschiede können dann genutzt werden, um Individuen zu Populationen zuzuordnen oder Populationen voneinander abzugrenzen (Campbell et al. 2003).

Als quantitative Parameter zur Abschätzung von Differenzierungen und Gemeinsamkeiten in der genetischen Struktur wurden genetische Ähnlichkeiten und genetische Distanzen verwendet, die aus der Distanzmatrix errechnet werden (Nei 1972). Bei der Betrachtung der

AFLP-Untersuchung der Maiszünsler verschiedener Standorte wird deutlich, wie relativ klein die genetischen Distanzen der Individuen von verschiedenen Populationen sind. Dies bedeutet, dass sich nur geringe Unterschiede auf genetischer Ebene bei allen untersuchten Maiszünslerpopulationen finden lassen. Dies gilt für die deutschen Populationen, aber auch die genetische Distanz zur spanischen Population ist ebenfalls sehr gering. Der Mittelwert der genetischen Ähnlichkeit ist mit 0,80 innerhalb der deutschen Populationen und 0,79 unter Einbeziehung der spanischen Maiszünsler relativ hoch. Die hohe Übereinstimmung beim genetischen Hintergrund der untersuchten Maiszünslerpopulationen unabhängig vom geographischen Ursprung wird im Vergleich mit anderen Untersuchungen beim Maiszünsler deutlich, die einen Mittelwert der genetischen Ähnlichkeit zwischen Populationen von 0,44 ergaben (Xu et al. 1998) oder bei unterschiedlichen Populationen von Heuschrecken mit einem Wert von 0,48 (Chapco et al. 1992).

Die Resultate der AFLP-Untersuchungen wurden an Hand von Dendrogrammen graphisch dargestellt. Dabei wurde deutlich, dass trotz der geringen genetischen Distanzen zwischen den einzelnen Populationen, diese in sich aber homogen sind und sich klar voneinander abgrenzen lassen. Dies lässt auf das Vorhandensein diagnostischer Banden für einzelne Populationen schließen. Bei einer genaueren Untersuchung der amplifizierten AFLP-Fragmente fanden sich für einige Populationen tatsächlich Banden, die ausschließlich in dieser Gruppe vorkommen. Die scharfe Trennung der Populationen voneinander wird aber hauptsächlich auf das häufige Vorkommen quantitativer Marker zurückzuführen sein, also Banden, die nicht ausschließlich einer Population zuzuordnen sind, sondern in hohem Maße mit einer Gruppe assoziiert werden können.

Ein Vergleich der Auswertungen nach der UPGMA-Methode mit der Auswertung nach der Neighbour-Joining-Methode (NJ) zeigt minimale Unterschiede in der Zuordnung der einzelnen Populationen zueinander, abhängig von der gewählten Art der Clustering-Berechnung. Der Algorithmus dieser Berechnungsverfahren beinhaltet eine zufällige Komponente bei der Reihenfolge der Paarbildung (van de Peer & de Wachter 1994), was als Konsequenz zu geringen Änderungen in der Stellung der Populationen zueinander führt. Mehrere großangelegte vergleichende Untersuchungen der verschiedenen Methoden, kamen zu dem Schluss, dass bei zugrundelegung statistisch auswertbaren Daten, beide Methoden gut arbeiten und zu vernünftigen und vergleichbaren Ergebnissen gelangen (Sourdis & Nei 1988, Hillis 1996).

Beim Vergleich der AFLP-Dendrogramme der beiden verschiedenen Auswerteverfahren (UPGMA und NJ) zeigen sich geographische Übereinstimmungen, die in allen

Dendrogrammtypen eindeutig zueinander stehen, wie einerseits die Paarbildung der beiden ostdeutschen Standorte Oderbruch und Halle und andererseits die Gruppierung der beiden Populationen von unterschiedlichen Wirtspflanzen Bonn/Mais und Bonn/Beifuss. Dies wird auch durch die „Bootstrap-Analyse“ bestätigt. Diese Analyse wird verwendet, um Konfidenzintervalle bei phylogenetischen Stammbäumen zu errechnen und stellt damit eine statistische Methode dar, um die Zuverlässigkeit der Knotenpunkte zu bestimmen (Felsenstein 1985, Swofford et al. 1996).

Weniger eindeutig ist die Beziehung zwischen der spanischen Population im Vergleich zu den südwestdeutschen Standorten. Je nach Dendrogrammtyp der AFLP-Untersuchungen grenzt sich die spanische Population entweder von den deutschen Populationen ab, wie beim UPGMA-Dendrogramm nach Popgene (Abb. 4.3) oder die spanischen Maiszünsler clustern mit einer der südwestdeutschen Populationen zusammen, was der Fall ist bei den individuenbasierten Stammbäumen (Abb. 4.4 und Abb. 4.5). An diesen Knotenpunkten liegen die bootstrap-Werte, im Gegensatz zu den anderen Verzweigungen, allerdings auch unter 90%. Eine genaue Zuordnung aller untersuchten Populationen zueinander erwies sich als problematisch. Daran wird einmal mehr die genetische Ähnlichkeit aller untersuchten Maiszünslerpopulationen deutlich, was sich auch schon an Hand der Daten zur genetischen Distanz und genetischen Ähnlichkeit erkennen lässt. Nur ansatzweise lassen sich die Populationen nach ihrer geographischen Nähe einander zuordnen, wie etwa die beiden ostdeutschen Populationen. Die These „isolation by distance“ von Wright (1943), mit deren Hilfe genetische Unterschiede durch weite Entfernungen zwischen Populationen erklärt werden sollen (Hartl & Clark 1997), scheint auf die hier untersuchten Populationen nicht zuzutreffen. Die genetische Distanz ist zwischen der spanischen und den deutschen Populationen trotz der großen Entfernung voneinander sehr gering und die deutschen Populationen sind, unabhängig von ihrem geographischen Ursprung, untereinander, wie auch zu den spanischen Maiszünslern genetisch sehr ähnlich. Dies lässt auf eine hohe Stabilität in der genetischen Struktur beim Maiszünsler schließen. Die Konservierung des Genoms scheint hoch zu sein. Die geringen Unterschiede in der genetischen Struktur müssen in Richtung eines hohen Genaustauschs zwischen den Populationen gedeutet werden. Bei Untersuchungen über das Ausbreitungs- und Flugverhalten des Maiszünslers in den USA konnte beobachtet werden, dass in Einzelfällen Maiszünslerindividuen Entfernungen von 23-49 km in nur wenigen Nächten zurücklegen konnten (Showers et al. 2001) und durch solche Extremfälle damit zu einem hohen Genaustausch auch zwischen entfernter liegenden Populationen beigetragen wird.

Das in dieser Arbeit erzielte Ergebnis für Deutschland bestätigten Studien zur genetischen Populationsstruktur beim Maiszünsler aus anderen Ländern (Bourguet et al. 2000). Untersuchungen französischer Maiszünslerpopulationen auf der Basis der Analyse von Isoenzymen zeigten nur geringe genetische Differenzierungen zwischen Populationen verschiedener geographischer Herkünfte und ergaben einen hohen Genfluss zwischen den einzelnen Populationen und innerhalb von Populationen (Bourguet et al. 2000a). Ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der genetischen Struktur ergaben RAPD-Untersuchungen chinesischer Maiszünslerpopulationen (Xu et al. 1998). Hohe Ähnlichkeiten in der genetischen Struktur verschiedener Populationen können das Ergebnis einer Vielzahl von Faktoren sein, von denen einige hier aufgezählt werden sollen. Die Auftrennung in unterschiedliche Populationen könnte vor nicht all zu langer Zeit stattgefunden haben (1), oder es besteht ein hoher Genaustausch zwischen den Populationen (2), oder es handelte sich um große Populationen mit geringer genetischer Drift (3), oder derselbe Selektionsdruck beeinflusste die verschiedenen Loci in derselben Art und Weise (Hedrick 2000). Da die betreffenden Populationen möglicherweise durch diese Faktoren in der Vergangenheit beeinflusst wurden, ist es schwierig ihren jeweiligen Einfluss zu rekonstruieren. Mehr als nur ein Faktor, oder möglicherweise alle, könnten zur heutigen Struktur der Populationen beigetragen haben.

Wie zu erwarten, lässt sich *P. xylostella* als bewusst gewählte „outgroup“ deutlich von den Maiszünslern abgrenzen, da es sich dabei nicht nur um eine andere Art, sondern um eine andere Familie (Plutellidae) handelt. Durch die Miteinbeziehung einer outgroup wurden zusätzliche Informationen erlangt, um die genetischen Distanzen zwischen den Maiszünslerpopulationen besser interpretieren zu können. Grundsätzlich sollten outgroups beim Erstellen von Dendrogrammen verwendet werden, um einen „rooted tree“ zu bekommen. (Koch & Jung 1997, Hedrick 2000). Weiterhin lassen sich in einigen der untersuchten Populationen die Individuen nach männlichen und weiblichen Tieren trennen. Betrachtet man die Population der spanischen Maiszünsler so clustern diese deutlich in Männchen und Weibchen. Eine geschlechtsspezifische Auftrennung ist ebenfalls bei den beiden Bonner Populationen und weniger eindeutig bei der Population Karlsruhe zu beobachten. Dies deutet auf die Amplifikation geschlechtsspezifischer Banden hin, die auch schon bei anderen Tieren durch AFLPs detektiert werden konnten (Baker 2000). Durch eine Identifizierung dieser Banden könnte eine Geschlechterbestimmung von Maiszünslern an Hand der DNA auch dann erfolgen, wenn diese Unterscheidung über phänotypische Merkmale nicht möglich ist, wie etwa im Ei- oder Larvenstadium.

Betrachtet man den Shannon-Index als Maß für die genetische Diversität, fällt auf, dass alle untersuchten Maiszünslerpopulationen im Vergleich zu *P. xylostella* einen hohen Shannon-Index aufweisen und damit genetisch sehr divers sind. Dies lässt sich durch den Polymorphiegrad bestätigen. Eine hohe genetische Variabilität von Maiszünslerpopulationen ergaben ebenfalls Untersuchungen von Xu et al. (1998). Am meisten divers zeigten sich die Populationen im Oderbruch und die Maispopulation im Bonner Raum (Unteres Rheintal). Bei diesen Standorten handelt es sich in beiden Fällen um Gebiete, die erst seit relativ kurzer Zeit vom Maiszünsler besiedelt werden, zumindest was die Wirtspflanze Mais betrifft. Eine Besiedelung des Maiszünslers in Gebieten nördlich der deutschen Mittelgebirge konnte erst im letzten Jahrzehnt beobachtet werden (Schmitz et al. 2002). Im Bonner Raum wurden schon über einen längeren Zeitraum Maiszünsler im Beifuss gefunden (Langenbruch & Szewczyk 1995) und die an Dikotylen lebende E-Rasse ist bis nach Skandinavien verbreitet (Karsholt & Razowski 1996). Ein Befall des Mais in der unteren Rheintalregion ist erst vor einigen Jahren nachgewiesen wurden. Im Gegensatz dazu, sind in den südwestdeutschen Maisanbaugebieten Schäden durch den Maiszünsler seit 1922 bekannt (Babcock & Vance 1929). Ob es in den Gebieten Oderbruch und Bonn eine Vermischung der Maiszünsler von unterschiedlichen Wirtspflanzen gegeben hat, die zu einer hohen genetischen Diversität geführt haben könnte, ist unklar. Die Gruppierung der beiden untersuchten Maiszünslerpopulationen aus dem Bonner Gebiet miteinander, die in den Dendrogrammen beobachtet werden konnte, kann als Hinweis dafür gewertet werden. Allerdings lassen sich Maiszünsler der verschiedenen Wirtspflanzen klar voneinander abgrenzen und clustern jeweils als eigenständige Gruppe. Interessant wäre, ebenfalls Maiszünsler aus Beifuss der Region Oderbruch mit in die Untersuchungen einzubeziehen. Bourget et al. (2000b) fanden in ihren Isoenzymuntersuchungen französischer Mais- und Beifusspopulationen eine Differenzierung auf genetischer Ebene zwischen den Maiszünslern mit unterschiedlichen Wirtspflanzen. Eine weitere, breiter angelegte Studie kam zu demselben Ergebnis (Martel et al. 2003). Dies konnte durch die AFLP-Analyse für den Standort Bonn nicht bestätigt werden. Ob es sich bei den untersuchten Tieren der Bonner Region wirklich um zwei verschiedene Rassen handelt, muss durch weitergehende Untersuchungen und einer genauen Analyse der Pheromonzusammensetzung noch bestätigt werden. Möglich wäre in diesem Fall auch eine Hybridisierung zwischen beiden Rassen oder eine Besiedelung des Mais durch die E-Rasse (Lorenz 1993). Hybridisierung zwischen beiden Rassen ist möglich, besonders an Orten, wo beide Rassen vorkommen (Klun 1975, Anglade et al. 1984).

Genfluss innerhalb und zwischen Maiszünslerpopulationen kann einen Schlüsselfaktor in der nachhaltigen Nutzung von transgenem insektenresistentem Mais darstellen (Bourguet et al. 2000a). Besondere Bedeutung könnte dabei einem potentiellen Genfluss zwischen E- und Z-

Rasse zukommen, da die eher in Ackerunkräutern vorkommende E-Rasse als Refugium für nicht resistente Maiszünsler mit in das bereits erwähnte „high dose/refuge“ Konzept (Alstad & Andow 1995) einbezogen werden könnte (Gould 1998). Refugien in Form von nicht-transgenen Pflanzen müssen daher nicht zwangsläufig nur aus Maisarealen bestehen. Grundsätzlich sollten Refugien die Exposition der Zielorganismen gegenüber Bt verringern und somit eine Anpassung der Insekten an den transgenen Mais durch Selektion minimieren und damit die Entstehung von resistenten Tieren verzögern (McGaughey & Whalon 1992; Tabashnik 1994; Ramachandran et al. 2000). Die Möglichkeit, geographisch abgrenzbare Maiszünslerpopulationen unterscheiden zu können, erlaubt die Abschätzung des Genflusses unter Maiszünslern. Diese Information ist wichtig als Basis zur Einschätzung der zukünftig eventuell zu erwartenden Resistenzentwicklung und für den Umgang mit im Entstehen begriffener Resistenz (Caprio & Tabashnik 1992).

Als Vergleich zur AFLP-Methode wurden verschiedene Maiszünslerpopulationen mit Hilfe der RAPD-Analyse untersucht. Die RAPD-Untersuchung war noch vor Jahren die verwendete Standardmethode für die hier bearbeitete Fragestellung. Untersuchungen amerikanischer Maiszünsler (Pornkulwat et al. 1998) mit RAPDs ermöglichten eine Differenzierung in verschiedene geographische und voltine Populationen. Bei chinesischen Maiszünslern und nahe verwandten Arten derselben Gattung nutzten auch Xu et al. (1998) die RAPD-Methode, um genetische Variationen zu untersuchen. Bei den hier durchgeführten RAPD-Untersuchungen sollten zwei unabhängige Methoden in ihrer Leistungsfähigkeit verglichen werden, um abschließend zu entscheiden, welches der beiden Verfahren für die hier untersuchten Fragestellungen sinnvoller ist. Vergleicht man die erzielten Ergebnisse der beiden Methoden miteinander fällt zunächst einmal auf, dass die Anzahl der amplifizierten Banden bei den verschiedenen Methoden unterschiedlich sind. Bei der AFLP-Analyse konnten mit neun Primerkombinationen 254 Fragmente zur Auswertung benutzt werden. Mit der RAPD-Methode wurden mit acht unterschiedlichen Primern dagegen nur 62 auswertbare Banden amplifiziert. Durch den Vergleich wird deutlich, dass durch die AFLP-Methode mehr Informationen erlangt werden konnten, als mit den RAPDs. Dies wird auch in der Literatur durch Untersuchungen an anderen Systemen bestätigt (Koch & Jung 1997, Baker 2000, Cabrita et al. 2001). Mit beiden Methoden erhaltene Ergebnisse zeigen eine generelle Übereinstimmung. Der Vergleich beider entsprechenden Popgene-Dendrogramme (Abb. 4.3 und Abb. 4.7) macht dies besonders deutlich. Die Zuordnung der Populationen zueinander bleibt gleich, wie etwa die Paarbildung Karlsruhe - Freiburg und Bonn/Beifuss - Bonn/Mais. Wie *P. xylostella* - als outgroup der AFLPs - trennt sich *S. nonagrioides* - als outgroup der RAPDs - weit von den Maiszünslerpopulationen ab. Betrachtet man die beiden Treecon-Dendrogramme im Vergleich zu den AFLPs zeigen sich hier kleine Unterschiede. Auffallend

dabei aber ist, dass keine so deutliche Trennung der Populationen untereinander erreicht werden konnte, wie bei den AFLPs. Besonders die südlichen Rheintalpopulationen Freiburg und Karlsruhe vermischten sich mit der Population vom Bodensee (Abb. 4.8). Dies weist auf das Fehlen diagnostischer Banden in der Unterscheidung dieser Populationen bei den RAPDs hin. Auch beim Vergleich der bootstrap-Werte zeigt sich eine eindeutigere Auftrennung der einzelnen Populationen durch die AFLP-Methode. Beim Vergleich der genetischen Ähnlichkeit (berechnet nach Nei 1972) zeigen sich nur geringe Abweichungen zwischen den beiden Methoden. Auch Lefebvre et al. (2001) weisen in Untersuchungen mit Kulturpflanzen auf eine akzeptable Übereinstimmung in den Ergebnissen bei vergleichenden Diversitätsuntersuchungen mit RAPD und AFLP-Methode hin.

Eine geschlechtsspezifische Differenzierung ist bei den in dieser Arbeit erhaltenen RAPDs nur bei der untersuchten spanischen Population zu erkennen, sowohl bei dem UPGMA-Stammbaum wie auch bei dem NJ-Dendrogramm. Der Nachteil der RAPDs liegt neben dem bereits erwähnten geringeren Informationsgehalt sicherlich hauptsächlich in der schlechten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (Jones et al. 1997, Reineke et al. 1997, Pornkulwat 1998, Baker 2000), die auch in dieser Untersuchung bestätigt werden konnte. Dagegen ist der Vorteil der RAPDs gegenüber den AFLPs in der Einfachheit der Methode, der weitaus kostengünstigeren Untersuchungen und dem geringen Materialbedarf zu sehen (Baker 2000, Goulao et al. 2001).

5.2 Toxizitätstest zur Ermittlung der Basissuszeptibilität

Die Erfassung der Basissuszeptibilität und die weitere Kontrolle der Suszeptibilität einzelner Maiszünslerpopulationen gegenüber dem Bt-Toxin ist eine wichtige Grundvoraussetzung für den Erfolg des „high dose“ Konzeptes und dessen Nachhaltigkeit. Ostlie et al. (1997) stellten schon früh Überlegungen an, wie hoch eine hohe Dosis über dem Suszeptibilitätsniveau liegen muss und forderten entsprechende Basistoxizitätsdaten. Die Dosis, die alle Larven tötet, sollte für die unterschiedlichen Populationen bekannt sein, um die „high dose“ Strategie effektiv nutzen zu können (Huang et al. 1999a) und damit gegebenenfalls die Resistenzbildung zu verlangsamen.

In dieser Arbeit kamen zwei Testverfahren – die Untermischmethode und die Oberflächenapplikation – zur Anwendung. Bei der Untermischmethode wird das Toxin gleichmäßig mit dem Maiszünslerfutter (Nährmedium) vermischt. Bei der Oberflächenapplikation wird nach Erkalten des Nährmediums eine dünne Schicht der Toxinlösung auf das Futter gegeben. Der Vergleich beider Methoden sollte Hinweise geben, welche Methode für ein zukünftiges Suszeptibilitäts-Monitoring geeigneter ist.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigten nur geringe Abweichungen in der Basissuszeptibilität bei den verschiedenen Maiszünslerpopulationen. Dies lässt darauf schließen, dass keine großen Unterschiede in der Suszeptibilität für die einzelnen südwestdeutschen Populationen zu erwarten sind. Einzig Maiszünsler aus dem Bonner Raum wiesen in Tests mit Monsanto-Toxin nach der Untermischmethode eine leicht erniedrigte Empfindlichkeit gegenüber dem Cry1Ab-Toxin auf. Ähnlich geringe Toxizitätsunterschiede fanden auch Marcon et al. (1999a) und Huang et al. (1997) in ihren Untersuchungen einzelner US-amerikanischer Maiszünslerpopulationen verschiedener geographischer Herkunft und Pheromonrassen. Deren und die eigenen Daten weisen auf eine geringe genetische Differenzierung verschiedener Populationen in Bezug auf die Empfindlichkeit gegenüber Bt-Toxinen hin (Marcon et al. 1999b). Keine Unterschiede fanden sich ebenfalls in untersuchten spanischen Maiszünslerpopulationen (Gonzalez-Nunez et al. 2000). Beim Vergleich der LC_{50} -Werte mit denen anderer Untersuchungen fallen dagegen Schwankungen auf. Vergleicht man die hier erzielten Werte der Oberflächenapplikation ($3,62 \text{ ng/cm}^2$ Monsanto-Toxin und $17\text{-}35 \text{ ng/cm}^2$ Neustadt-Toxin) mit denen amerikanischer Populationen ($2\text{-}10 \text{ ng/cm}^2$) und spanischen Maiszünslern ($\approx 100 \text{ ng/cm}^2$), ergeben sich große Schwankungen (Marcon et al. 1999a, Gonzalez-Nunez et al. 2000). Diese Unterschiede resultieren wohl weniger aus der natürlich vorkommender Variabilität, als vielmehr aus der unterschiedlichen Toxinherstellung (verschiedene Toxingehalte) oder Durchführung und Auswertung der Tests. Ein zusätzlicher

Vergleich der Ergebnisse von amerikanischen Freilandpopulationen gegenüber Bt-Toxin (Huang et al. 1997) ist nicht möglich, da durch die Verwendung eines handelsüblichen Bt-Präparates (Dipel) ein Gemisch von mehreren Bt-Toxinen, Sporen und Formulierung eingesetzt wurde. Tests zur Basissuszeptibilität sollten dagegen, wie in dieser Arbeit, möglichst mit reinem Toxin durchgeführt werden, da eine Veränderung in der Empfindlichkeit damit leichter detektiert werden kann (Stone & Sims 1993).

Betrachtet man vergleichend die Toxizitätsergebnisse einer frisch gesammelten Freilandpopulation mit denen des entsprechenden Laborstamm (gleiche Herkunft) nach mehreren Zuchtgenerationen, so sind keine Unterschiede in der Empfindlichkeit zu erkennen. Es müssen daher nicht zwangsläufig nur im Freiland gesammelte Maiszünsler für den Test eingesetzt werden, sondern diese können auch erst für einige Generationen im Labor weitergezüchtet werden, bevor alle Testreihen abgeschlossen sind (Reed & Halliday 2001). Dieser Nachweis erlaubt mehrere Testwiederholungen mit aufeinanderfolgenden Laborzucht-Generationen durchzuführen, was erheblich zur Zuverlässigkeit der Ergebnisse beitragen kann.

Der Vergleich von Toxinen aus unterschiedlicher Herstellung (Monsanto-Toxin – Neustadt-Toxin) zeigt ein vor Beginn der Versuche unterschätztes Problem auf. Gleiche Toxine verschiedener Produktionszyklen können zu erheblichen Abweichungen in der nachgewiesenen Empfindlichkeit der Larven führen. Beim Einsatz der beiden verkürzten Cry1Ab-Toxine ergaben sich, je nach verwendeter Methode, Unterschiede um den Faktor 7 (Oberflächenapplikation) bzw. 9,5 (Untermischmethode). Das Problem von zum Teil erheblichen Schwankungen in der Basissuszeptibilität, hervorgerufen durch verschiedene Produktionszyklen des gleichen Toxins, zeigte sich auch in Untersuchungen spanischer Maiszünsler und Maisbohrer, *Sesamia nonagrioides* (Farinos et al. 2003). Daher konnten dort auch nur Ergebnisse verglichen werden, deren Daten mit derselben Toxincharge (aus demselben Produktionszyklus) ermittelt wurden. Für zukünftige Suszeptibilitätstests ist es unerlässlich eine gleichbleibende Toxinqualität zur Verfügung zu haben und möglichst nur Toxin aus ein und demselben Produktionszyklus zu verwenden, um die Ergebnisse vergleichen zu können und Änderungen in der Suszeptibilität sicher zu detektieren. Dabei stellen sich die Fragen nach der Toxinlagerung und Haltbarkeit, die in weiteren Untersuchungen noch geklärt werden müssen.

Beim Vergleich der beiden Testmethoden, Untermischen des Toxins oder Applikation auf die Mediumoberfläche, konnten Vor- und Nachteile der beiden Methoden erkannt werden. Ein wichtiger Vorteil der Oberflächenapplikation ist sicherlich der geringere Arbeitsaufwand und

niedrigere Verbrauch an Toxin. Nachteilig sind mögliche Randeffekte und die Gefahr eines Durchfressens der Larven durch die Toxinschicht in das darunter liegende toxinfreie Nährmedium. Diese Effekte könnten auch unterschiedlich stark in verschiedenen Populationen ausgeprägt sein und eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse beider Methoden im Vergleich der Populationen zueinander geben.

Die Nachteile der Untermischmethode liegen entsprechend bei einem höheren Toxinbedarf und einer aufwändigeren Testauswertung, da sich kaum Larven auf der Oberfläche befanden. Das homogene Untermischen des Toxins nahm ebenfalls Zeit in Anspruch, danach konnten allerdings ohne weitere Wartezeiten anders als bei der Oberflächenapplikation (Erstarren des Mediums und Trocknung des Toxins), direkt die Larven eingesetzt werden. Ein wichtiger Vorteil bei der Untermischmethode ergibt sich bei der Berechnung, da die aufgenommene Toxinmenge proportional zur gefressenen Futtermenge ist und sich aus dieser Konzentrationsangabe ($\mu\text{g Toxin/g Futter}$) eine genauere Einheit für die Empfindlichkeit angeben lässt.

Die Entstehung von Resistenzen wird unter anderem beeinflusst von einer natürlichen Variation in der Empfindlichkeit gegenüber Bt-Toxin. In Untersuchungen zur Basissuszeptibilität von Freilandpopulationen des Maiszünslers fanden Siegfried et al. (1995) bis zu fünffache Unterschiede in der Empfindlichkeit verschiedener Populationen. Während solche Schwankungen als Potential für eine Resistenzbildung angesehen werden (Rossiter et al. 1990), stellen sie darüber hinaus auch gleichzeitig eine Schwierigkeit in der Unterscheidung zwischen einer gerade beginnenden Resistenz und natürlich vorkommenden Schwankungen dar (Koziel et al. 1993, Glare & O'Gallaghan 2000). Um die hohe Effektivität von Bt-Pflanzen dauerhaft nutzen zu können, ist es notwendig, Änderungen in der Suszeptibilität rechtzeitig zu erkennen (Gonzales-Nunez et al. 2000). Dies kann nur durch periodische Wiederholungen des Toxizitätstest und Beobachtung der Abweichungen von den Basistoxizitätswerten gewährleistet werden.

5.3 Selektion auf toxinhaltigem Futter

Die beste Resistenzmanagementstrategie kann nur entwickelt werden, wenn Basisdaten über die Resistenz bei dem entsprechenden Organismus bekannt sind (McKenzie 1996). Um

die Entstehung einer möglichen Resistenz gegenüber Bt-Toxinen beim Maiszünsler besser verstehen und untersuchen zu können, wäre die Verfügbarkeit eines resistenten Laborstammes eine wichtige Voraussetzung. Dies hat viele Bemühungen nach sich gezogen, durch langandauernde Selektion im Labor die Empfindlichkeit von Maiszünslerlarven gegenüber Bt-Toxinen zu verringern. Laborstämme mit herabgesetzter Empfindlichkeit konnten bei Maiszünslern aus Iowa (Huang et al. 1997), Kansas (Huang et al. 1999a), Minnesota (Bolin et al. 1999), Nebraska und Frankreich (Chaufaux et al. 2001) und Spanien (Farinos et al. 2003) selektioniert werden. Die „high dose/refuge“ Strategie geht von einer rezessiv vererbten herabgesetzten Fitness bei resistenten Tieren aus. Das Überleben und die Fitness heterozygoter Tiere hängt dabei nicht nur von der Dominanz des suszeptiblen Resistenzallels, sondern auch von dem Resistenzniveau, das durch diese Resistenzallele vererbt wird, ab (Bourguet et al. 2000a). Daher ist es wichtig zu bestimmen, ob das geringe Resistenzniveau, von dem sowohl Huang et al. (1997, 1999a), wie auch Bolin et al. (1999) und Chaufaux et al. (2001) berichteten, ein natürliches Merkmal in Maiszünslerpopulationen ist. Ob möglicherweise ein höheres Resistenzniveau durch Laborselektion über einen längeren Zeitraum erreicht werden kann, könnte erste wichtige Hinweise auf eine mögliche Veränderung des Resistenzniveaus unter Selektionsdruck von Bt-Mais im Freiland ergeben.

Der in dieser Arbeit verwendete Laborstamm aus dem südlichen Rheintal entwickelte signifikant erhöhte Toleranz nach chronischer Exposition gegenüber verkürztem Cry1Ab-Toxin. Dieses Ergebnis ähnelte den bereits erwähnten Untersuchungen, bei denen auch eine signifikante Abnahme in der Empfindlichkeit gegenüber Bt-Toxin auftrat. Allerdings sind die hier erreichten Änderungen mit etwa 9-fach erhöhter Toleranz in der 9. Generation deutlich geringer als in den Versuchen von Huang et al. (1997) (73fach) und Bolin et al. (1999) (162-fach) und ähneln eher den Werten von Chaufaux et al. (13 - 14-fach). Farinos et al. (2003) erreichten ebenfalls nach acht Generationen Selektion nur eine etwa um den Faktor 10 veränderte Suszeptibilität. Eine mögliche Erklärung liegt in der Durchführung der Toxizitätstests. Als Bolin et al. (1999) die Methode von der Oberflächenapplikation zur Untermischmethode änderten, sank die Toleranz der Larven von 162-fach auf 16 - 56-fach. Chaufaux et al. (2001) verwendeten ebenfalls (wie in diesen Untersuchungen) von Beginn an die Untermischmethode zur Selektionierung und Ermittlung des LC_{50} . Eine weitere Möglichkeit für die geringeren Toleranzwerte der europäischen Untersuchungen könnte in einem Unterschied in der genetischen Struktur amerikanischer und europäischer Maiszünsler begründet sein. Weiterhin kann auch der Einsatz verschiedener Toxine oder eine unterschiedliche Herstellung der verwendeten Toxine einen Einfluss auf das Ergebnis haben. Eine erneute Überprüfung der Suszeptibilität nach weiteren neun Generationen in der 18. Laborgeneration ergab ebenfalls wieder eine um den Faktor 9 herabgesetzte Empfindlichkeit der Larven. Damit bestätigt sich die Stabilität dieser Änderung auch in

nachfolgenden Generationen unter Selektionsdruck. Eine weitere Erhöhung des LC50 und damit eine Zunahme in der Toleranz konnte bislang nicht beobachtet werden. Der vergleichend durchgeführte Test mit Bt-Blattmaterial zeigte, dass die Larven durch die chronische Exposition auf eine Toleranz gegenüber Bt-Toxin selektioniert werden konnten, eine wirkliche Resistenz aber noch nicht vorlag. Allele, die ein hohes Resistenzniveau vermitteln, scheinen sehr selten zu sein. Andow et al. (1998, 2000) und Andow & Alstad (1999) schätzten die Häufigkeit dieser Allele auf $< 3,9 - 9 \times 10^{-3}$ (95%CI) für verschiedene amerikanische Maiszünslerpopulationen. Dementsprechend ist es nicht überraschend, dass in der hier getesteten Laborpopulation durch Selektion keine Resistenz erreicht werden konnte und das Fehlen von Resistenzallelen in der Ausgangszucht wahrscheinlich ist. Trotzdem zeigen diese Ergebnisse, dass ein niedriges Niveau an Toleranz gegenüber Bt durch Selektion erreicht werden kann. Vergleicht man dies mit den anderen Untersuchungen scheint ein gewisses Maß an Toleranz in den verschiedenen Populationen nicht all zu selten vorzukommen. Allele für eine partielle Resistenz oder Toleranz gegenüber Bt-Toxinen scheinen dementsprechend häufiger in Maiszünslerpopulationen vorzukommen. Allele für eine echte Resistenz, die auch ein Überleben auf Bt-Mais möglich machen würden, scheinen sehr selten zu sein (Farinos et al. 2003).

Eine Resistenz bei Insekten kann unter Laborbedingungen durch Selektion erreicht werden, ist aber oft nicht stabil (Glare & O’Gallaghan 2000). In Selektionsversuchen mit der Kohlschabe *Plutella xylostella* nahm der erreichte Grad der Resistenz wieder ab, nachdem die Exposition mit dem entsprechenden Toxin aufhörte (Tabashnik et al. 1994). Eine Reduzierung in der Fitness, die in Verbindung mit der Resistenz auftritt, ist der wahrscheinlichste Grund für die Instabilität von Resistenzen. Eine herabgesetzte Fitness bei resistenten Tieren kann durch pleiotrophe Effekte bedingt sein (McKenzie 1996). Pleiotropie tritt dann auf, wenn ein Gen mehr als ein phänotypisches Merkmal beeinflusst (Hennig 1995). Die Fähigkeit höhere Konzentrationen eines Toxins zu überleben wird oftmals eingetauscht gegen eine Verminderung der Fitness, wie beispielsweise die Wachstumsrate, die Lebensdauer oder die Fertilität (Roush & McKenzie 1987). Nur indem man die Instabilität von Resistenzen verstehen lernt, kann geklärt werden, aus welchem Grund eine Resistenz gegenüber Bt bislang beim Maiszünsler im Freiland nicht beobachtet werden konnte. Dies kann bei der Erarbeitung von Strategien zur Verhinderung von Resistenzbildung von Nutzen sein.

5.4 Sammeln von Maiszünslern in transgenem Mais

Die Suche nach Maiszünslerlarven auf oder in Bt-Maispflanzen wurde auf dem Versuchsfeld der RWTH bei Bonn/Euskirchen während der gesamten Dauer des Experiments (2001-2003) jeweils im Herbst durchgeführt. Nur im Jahr 2002 wurden vier lebende L5-Larven gefunden, deren Wirtspflanzen sich durch Analyse des Genoms als nicht transgen (Bt-toxin-haltig) herausstellten. Diese seltenen Funde deuten auf ein Einwandern der Larven aus Nachbarparzellen hin, die konventionellen, nicht gentechnisch veränderten Mais enthielten.

Das Überleben einzelner Maiszünsler in Feldern mit transgenem Mais muss nicht zwangsläufig auf resistente Tiere hindeuten. Bis zu 4 % im Saatgut von gentechnisch verändertem Mais kann aus nicht-transgenen Samen bestehen (Bolin et al. 1998). Um dies auszuschließen wurden Blatt- und Kolbenproben der befallenen Pflanzen genommen und die DNA auf das Vorhandensein des neu eingebrachten Bt-Gens untersucht.

Der PCR-Nachweis zeigte, dass sich die gesammelten vier Larven aus der Bt-Mais Parzelle wirklich auf gentechnisch veränderten Maispflanzen mit dem Bt-Konstrukt der Firma Monsanto befanden. Das Fehlen von Fraßspuren deutet jedoch darauf hin, dass sich die Tiere an diesen Pflanzen nicht über einen längeren Zeitraum aufhielten. Bei kleinparzelligen Versuchen, kann das Auftreten von Maiszünslerlarven in transgenen Maisparzellen auf Einwanderung aus anderen Parzellen zurückgeführt werden. Entsprechende Beobachtungen wurden von Ross & Ostlie (1990) und Bolin et al. (1998) in ähnlichen Versuchen gemacht. Möglich wäre auch ein kurzfristig erfolgter Wechsel von einer der nicht-transgenen Pflanzen, die durch die bereits erwähnte Saatgutverunreinigung in dieser Parzelle vorkommen könnte. Außerdem können Larven in fortgeschrittenen Larvenstadien (L4 und L5) das bis zu 400fache an Bt-Toxin im Vergleich zu frisch geschlüpften Larven (L1) ertragen (Davies & Coleman 1997).

5.5 Optimierung der Zuchtbedingungen – Mikrosporidiennachweis

Wichtig bei einer kontinuierlichen Laborzucht von Maiszünslern ist die frühe Detektion von Krankheiten oder ihren Erregern. Dies ist von besonderer Bedeutung, wenn ständig neues Ei- oder Larvenmaterial vom Freiland in die bestehenden Laborstämme integriert wird. Da einige Krankheitserreger, wie etwa Mikrosporidien, transovariell übertragen werden können, muss auch ein Infektionsweg über die Eigelege beachtet werden. Da sich die Detektion und Identifizierung von Protozoen als schwierig und zeitaufwändig herausstellte, sollte mit Hilfe von molekularen Methoden, wie der PCR, der Nachweis von Mikrosporidien und die Bestimmung der maiszünslerspezifischen Gattung *Nosema* erfolgen. Sowohl ein genereller Mikrosporidiennachweis, wie auch der spezifische Gattungsnachweis konnten erfolgreich mit der PCR mit den entsprechenden Primerpaaren durchgeführt werden. Die Isolierung von Maiszünsler-DNA erwies sich als unproblematisch. Um Zeit und Kosten zu sparen, könnte für zukünftige Mikrosporidienuntersuchungen und für eine dauerhafte Überprüfung der Zuchten ein Teil der DNA, die für die molekularen Diversitätsbestimmungen bestimmt sind, eingesetzt werden. Da bei der PCR schon geringste Mengen an DNA für einen Nachweis genügen (Newton & Graham 1994), würde eine Entnahme von DNA in keinster Weise die anschließenden molekularen Untersuchungen zur Verwandtschaftsbestimmung stören. Damit ist diese molekulare Methode zur Detektion von Mikrosporidien als eine sinnvolle Alternative zu herkömmlichen histologischen Untersuchungen anzusehen.

5.6 Ausblick für den Aufbau eines Resistenz-Monitoringsystems für den Maiszünsler in Deutschland und Europa

Als Konsequenz für ein zukünftiges Monitoring der Bt-Toxin - Suszeptibilität deutscher Maiszünsler lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen folgern, dass die Auswahl einer repräsentativen Population für den südwestdeutschen Raum zur Beobachtung und Überwachung ausreicht. Dies lässt sich zum einen aus den Daten der molekularbiologischen Diversitätsuntersuchungen ableiten, die eine große genetische Ähnlichkeit der verschiedenen Populationen in diesem Gebiet aufzeigen. Die Ergebnisse der Suszeptibilitätstests zeigen zum anderen ebenfalls Übereinstimmungen zwischen den untersuchten Populationen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Populationen in dem hier untersuchten Gebiet untereinander sehr ähnlich sind und auch in ihrer Empfindlichkeit gegenüber Bt-Toxinen sich innerhalb tolerierbarer Schwankungen gleich verhalten werden. Da die Population im Raum „Unteres Rheintal/Bonn“ in einigen Untersuchungen eine geringere Empfindlichkeit aufzeigte, sollte diese Population gegebenenfalls noch näher untersucht und besonders zur Beifuss-Rasse hin abgegrenzt werden. Die Ermittlung von Basissuszeptibilitätsdaten gegenüber Bt-Toxin vor der großflächigen Nutzung von Bt-Mais repräsentiert einen ersten und entscheidenden Schritt zur Entwicklung von Monitoringprogrammen zum möglichst frühzeitigem Auftreten von Resistenzen beim Maiszünsler (Marcon et al. 1999a, Siegfried et al. 2000).

Die potentielle Exposition des Zielorganismus Maiszünsler gegenüber einer Selektion durch Bt-Toxine zu definieren, ist ein wichtiger Aspekt im Rahmen einer Risikoabschätzung zur Resistenzbildung (Fitt et al. 2003). Die Mobilität der Insekten, ihr Wirtspflanzenspektrum und die räumliche Anordnung der Pflanzen, sowie die Höhe der Expression des Bt-Toxins in der Pflanze sind nur einige der Parameter, durch die eine mögliche Exposition der Maiszünsler gegenüber Bt-Toxinen und einer dadurch beschleunigten Selektion beeinflusst wird. Das Ausbreitungsverhalten der Larven und der adulten Tiere stellt einen weiteren wichtigen Aspekt für ein Resistenzmanagement dar (Hunt et al. 2001). Damit können die Entfernungen, die Maiszünsler zurücklegen, besser abgeschätzt werden. Dieses Wissen ist unentbehrlich, um das Ausbreitungsmuster in einem lokalen räumlichen Rahmen nachvollziehen zu können und ein Resistenzmanagement darauf abzustimmen (Guse et al. 2002). Zum anderen sind diese Daten notwendig, um verstehen und vorhersagen zu können, wie sich eine entstandene Resistenz geographisch ausbreiten wird. Dafür ist eine Beobachtung der Ausbreitung von Maiszünslerpopulationen über weite Distanzen wichtig. Seltene Langstreckenverbreitung werden die Effizienz von Refugien nur wenig beeinflussen,

für eine Verbreitung einer einmal aufgetretenen Resistenz in andere Regionen oder andere Populationen sind solche Ereignisse aber wichtig (Fitt et al. 2003).

Für ein europaweites Resistenzmanagement sollten agro-ökologische Faktoren verschiedener geographischer Regionen mit in die Strategien einbezogen werden. Dabei stellt sich die Frage, wie viele verschiedene Regionen in Europa für eine Überwachung und Beobachtung ausreichen würden. Dies ist besonders im Hinblick auf die entstehenden Kosten einer solchen Überwachung abzuwägen. Berechnungen zufolge kommt man für einen Suszeptibilitätstest auf Kosten von etwa 10 Euro pro getestete Larve. In Abb. 5.1 sind mögliche Regionen für ein Resistenzmonitoring in Europa unter Berücksichtigung verschiedener Klimazonen dargestellt.

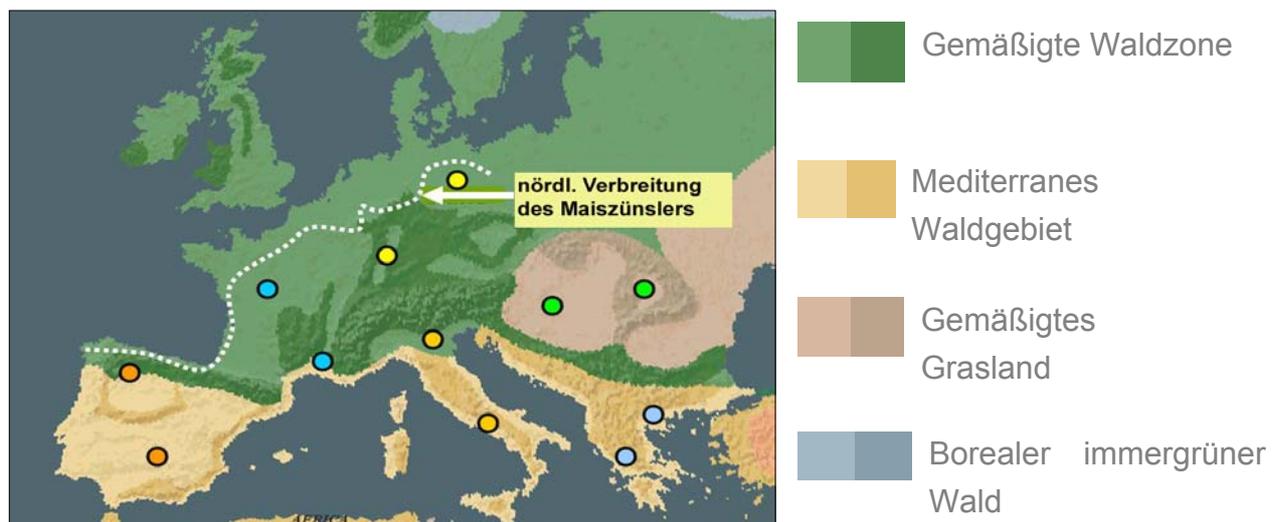


Abb. 5.1: Vorschläge für repräsentative Populationen, die aufgrund ihrer regionalen Verteilung in Europa geeignet sind für eine Überwachung einer möglicherweise auftretenden Resistenz gegenüber Bt-Toxinen. Die unterschiedlichen Farben repräsentieren die ökologischen Zonen, der dunklere Farbton verdeutlicht höhere Lagen. Die nördliche Verbreitungsgrenze wurde Schmitz et al. (2002) entnommen. Die Ökozonen Europas stammen aus Encarta Virtual Globe (1999).

Betrachtet man die Situation in südeuropäischen Ländern, müssen dort weitere Aspekte beachtet werden. So ist etwa die Mobilität von Maiszünslern auf bewässerten Feldern deutlich herabgesetzt (Hunt et al. 2001), was eine Einschränkung in der Nutzung von Refugien bedeuten kann. Weiterhin treten dort bivoltine und multivoltine Rassen des Maiszünslers und des mediterranen Kornbohrers (*Sesamia nonagrioides*) auf (Hill 1987, Lopez et al. 2001).

Da in Spanien schon seit 1998 auf 22.000 ha Bt-Mais angebaut wird, dies entspricht 5% der gesamten Maisanbaufläche, findet man hier eine andere Ausgangssituation als in den restlichen EU-Staaten. Besonders durch den Anbau des Mais-Event Bt 176, der keine gleichmäßige Expression des Toxins über die gesamte Vegetationsperiode aufweist, besteht eine höhere Wahrscheinlichkeit eines Überlebens der in Bezug auf die Resistenz heterozygoten Larven der zweiten oder dritten Generation (Farinos et al. 2003). Durch den Einsatz dieser Bt-Sorte in Spanien kann die „high dose“ Strategie dort nicht mehr uneingeschränkt angewandt werden.

Dies macht deutlich, wie wichtig eine Anpassung der Managementstrategien an regionale Gegebenheiten ist und das für jedes Gebiet, in dem in Zukunft Bt-Mais in Europa angebaut werden soll, eine spezifische Prüfung der lokalen Situation notwendig ist.

6. Zusammenfassung

Vor einem möglichen künftigen weiträumigen Anbau insektenresistenter Maispflanzen muss darauf geachtet werden, dass die Nutzung von Bt-Toxingenen in landwirtschaftlich genutzten Kultursorten dauerhaft möglich wird.

Ziel dieser Arbeit war es daher, Methoden zu entwickeln, um möglicherweise sich langfristig entwickelnde Schadinsekten-Resistenzen gegen pflanzenexprimierende Bt-Toxine prognostizieren zu können. Dazu sollten Grunddaten zur Populationsstruktur des anvisierten Maisschädlings Maiszünsler in Deutschland ermittelt und Basiswerte zur Empfindlichkeit einzelner Populationen gegenüber den Bt-Toxinen erarbeitet werden. Diese Daten sollten die Grundlage schaffen, auf eine mögliche Resistenzentstehung frühzeitig reagieren zu können.

Zur Sicherung des ökologisch und ökonomisch wichtigen Wirkprinzips wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Erfassung und molekulare Charakterisierung in Deutschland vorhandener Maiszünslerpopulationen
- Aufbau von Maiszünslerzuchten aus verschiedenen deutschen Populationen
- Ermittlung des Basissuszeptibilitätsniveaus verschiedener deutscher Maiszünslerpopulationen gegenüber dem in transgenem Mais exprimierten Bt-Toxin Cry1Ab mit zwei unterschiedlichen Testmethoden
- Laborselektionierungen mit dem Ziel der Entstehung einer resistenten Maiszünslerpopulation

Folgende Ergebnisse wurden erarbeitet:

Im Rahmen der molekularen Charakterisierung deutscher Maiszünslerpopulationen konnte die AFLP-Methode reproduzierbar etabliert werden. Die hohe Zahl an Fragmenten, die mit AFLP-Primern zwischen Maiszünsler-Individuen detektiert werden konnten, zeigte, dass diese Fingerprint-Technik eine geeignete Methode zur Charakterisierung genetischer Differenzierung beim Maiszünsler darstellt. Durch den hohen Informationsgehalt kann die AFLP-Technik als hochsensible Methode angesehen werden, um genetische Variabilitäten aufzudecken. Die Komplexität eines AFLP-Bandenmusters variierte mit der Wahl und Anzahl der selektiven Nukleotide verschiedener Primerkombinationen. Durchschnittlich wurden 21-40 PCR-Fragmente pro Primerkombination detektiert. Bei der Verwendung von 9 Primerkombinationen ergab sich eine Gesamtzahl von 254 unterschiedlichen AFLP-Markern

für 150 Individuen, die zur Auswertung herangezogen wurden. Dabei ergaben sich nur geringe Unterschiede auf genetischer Ebene zwischen den untersuchten deutschen Populationen. Die genetische Distanz dieser Populationen zu spanischen Maiszünslern ist ebenfalls sehr gering. Die einzelnen Populationen sind in sich homogen und können eindeutig von den anderen Populationen abgegrenzt werden, was sich in den Stammbäumen graphisch darstellen lässt. Ansatzweise zeigten sich geographische Übereinstimmungen mit der Anordnung der Populationen in den Stammbäumen. Besonders deutlich wurde dies an Hand der Paarbildung der ostdeutschen Populationen. Durch die Ermittlung des Shannon-Index als Maß für die genetische Diversität innerhalb einzelner Populationen zeigte sich, dass alle Maiszünslerpopulationen in sich sehr divers sind.

Um die AFLP-Methode mit der herkömmlichen Methode zur Diversitätsbestimmung, der RAPD-PCR, vergleichen zu können, wurden zusätzlich zur AFLP-Untersuchung RAPDs durchgeführt. Dabei konnten durchschnittlich 5-9 Fragmente pro Individuum detektiert werden mit einer Gesamtzahl von 62 verschiedenen RAPD-Fragmenten bei der Auswertung von 8 Deca-Primern. Der Ergebnisvergleich beider unterschiedlicher Methoden zur Diversitätsuntersuchung zeigte eine recht gute Übereinstimmung. Mit beiden Methoden konnten auf Herkunftsebene die verschiedenen Populationen voneinander unterschieden werden. Bei der RAPD-Methode zeigte sich jedoch auf Individuenbasis eine Vermischung der Einzeltiere der südwestdeutschen Populationen. Dieser Unterschied zu den Ergebnissen der AFLP-Untersuchungen, bei der die Populationen auch auf Individuenbasis klar voneinander abgegrenzt werden konnten, ergab sich durch den höheren Informationsgehalt der AFLP-Methode gegenüber der RAPD-Analyse, die somit zu einer sichereren Aussagekraft der Ergebnisse führte.

Aus den AFLP-und RAPD-Untersuchungen ergibt sich für ein zukünftiges Monitoring, dass auf Grund von Populationsdifferenzierungen nur eine der südwestdeutschen Maiszünslerpopulationen und die ostdeutsche Population aus dem Oderbruch einbezogen werden sollten.

Auch die Ergebnisse der Suszeptibilitätstests zeigten nur geringe Abweichungen in der Basissuszeptibilität der verschiedenen Maiszünslerpopulationen gegenüber dem Cry1Ab-Toxin. Beim Vergleich der beiden verwendeten Testmethoden, Untermischen des Toxins in das Nährmedium oder Applikation auf die Mediumoberfläche, konnten Vor- und Nachteile der beiden Methoden zur Suszeptibilitätsermittlung erkannt werden. Bei der Untermischmethode lagen die ermittelten LC_{50} -Werte zwischen 0,12-0,41 $\mu\text{g/g}$ Medium für das von der Firma Monsanto produzierte verkürzte Cry1Ab-Toxin und zwischen 1,55-2,42

$\mu\text{g/g}$ für das verkürzte Toxin der SLFA Neustadt. Das verwendete Protoxin der Firma Syngenta lieferte Werte zwischen $0,82\text{-}1,02 \mu\text{g/g}$. Die LC_{50} -Werte bei einer Oberflächenapplikation des Toxins lagen bei $3,62 \text{ ng/cm}^2$ für das bereits erwähnte Monsanto Toxin und zwischen $16,50\text{--}35,14 \text{ ng/cm}^2$ für das Toxin der SLFA. Der Vergleich von Toxinen aus unterschiedlicher Produktion zeigte, dass gleiche Toxine aus verschiedener Herstellung erhebliche Abweichungen in den Ergebnissen zur Empfindlichkeitsermittlung der Larven verursachen. Beim Einsatz der beiden verkürzten Cry1Ab-Toxine ergaben sich je nach verwendeter Methode Unterschiede um den Faktor 7 (Oberflächenapplikation) bzw. 9,5 (Untermischmethode). Damit kann eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei einem Wechsel der Toxincharge nicht gewährleistet werden. Als Konsequenz für ein zukünftiges Monitoring der Suszeptibilität deutscher Maiszünsler lässt sich aus den vorliegenden Ergebnissen folgern, dass eine Population für den südwestdeutschen Raum zur Beobachtung und Überwachung ausreicht. Beide Testmethoden sind für die Ermittlung und Überwachung der Suszeptibilität geeignet. Ein wichtiger Vorteil der Oberflächenapplikation ist sicherlich der geringere Arbeitsaufwand und niedrigere Verbrauch an Toxin.

Durch eine Laborselektionierung von Maiszünslerlarven mit Cry1Ab-toxinhaltigem Medium sollte die Selektion einer möglichen resistenten Maiszünslerpopulation angestrebt werden. Für Laborselektionierung ist die Anwendung der Untermischmethode unverzichtbar. Anhand der erhaltenen Werte lässt sich erkennen, dass die Empfindlichkeit gegenüber Cry1Ab-Toxin bei den Maiszünslern unter Selektionsdruck nach 9-11 Generationen verringert war, sie entsprechend eine etwa neunfach höhere Konzentrationen von Bt-Toxin tolerieren konnten als die Tiere, die keinem Selektionsdruck ausgesetzt waren. Um festzustellen, ob es sich bei der gezeigten Änderung in der Suszeptibilität um eine Resistenzentwicklung handelte, wurde ein Test mit Bt-Maispflanzen durchgeführt. Dieser zeigte, dass ein Überleben auf transgenem Mais nicht möglich war.

Im Falle einer großflächigen Nutzung von Bt-insektenresistentem Mais kann durch die hier erarbeiteten Ergebnisse für ein anbaubegleitendes Monitoring und Resistenzmanagement auf grundlegende Basisdaten zurückgegriffen werden.

6.1 Abstract

Transgenic maize cultivars expressing *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin need management to avoid resistance development of the target pest species European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Huebner), the most important insect pest in corn. The European Corn Borer can reduce yields up to 20%. Due to the continuous expression of the Bt toxin during the vegetation period, a selection of resistant genotypes of the European Corn Borer is expected to be more likely than from conventional Bt sprays. Sustainability of transgenic plants use requires a solid understanding of the insect population for maintaining susceptible individuals. The aim of this work was to establish methods to be able to forecast a possible development of resistance in an early stage.

For this reason the baseline susceptibility of different ECB populations in Germany was measured. Tests were performed by treating first instar larvae with different Bt-toxin concentrations incorporated into the nutrition medium or applied onto the medium (surface treatment). LC₅₀ values of the different German populations ranged from 0,12-0,41 µg/g diet and 1,55-2,42 µg/g diet for truncated Cry1Ab depending on the production of the toxin. For untruncated Cry1Ab the LC₅₀ was between 0,82-1,15 µg/g diet. The surface treatment was carried out as comparison to the incorporation method. LC₅₀ values ranged from 16,50-35,14 ng/cm². No significant differences were detected for populations from different regions of Germany with both methods. Additional effort was spent into the methodology on how to detect susceptibility change through regular monitoring, including harmonization of different approaches in various research groups of EU countries.

The second part of the study identified geographical distinct ECB populations by help of molecular fingerprinting techniques such as AFLP and RAPD-PCR. Knowledge about the population structure is helpful for gene flow estimation, which is an essential information for resistance management. Based on dendograms fingerprint analysis, very small genetic differences were detected between populations. Although genetic distances were small, separation into distinct populations was possible by use of the AFLP method.

These data suggest little genetic differentiation among populations, both in terms of susceptibility to Bt toxin and of the genetic background. Future monitoring can sufficiently be performed concentrating on a single ECB population representative for south western Germany.

7. Verzeichnisse

7.1 Literaturverzeichnis

- Ackermann, R., Pönitz, K., Rochel, J. & Holschowsky, I. (2003) Larve gegen Stängel. Bauernzeitung 17, 21-23
- Ajmone-Marsan, P., Valentini, A., Cassandro, M., Vecchiotti-Antaldi, G., Bertoni, G. & Kuiper, M. (1997) AFLP markers for DNA fingerprinting in cattle. *Animal Genetics* 28, 418-426
- Aljanabi, S. M. & Martinez, I. (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25, 4692–4693
- Alstad, D.N. & Andow, D.A. (1995) Managing the Evolution of Insect Resistance to Transgenic Plants. *Science* 268, 1894-1896
- Andow, D.A. (2000) Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ab in Iowa population of European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Economic Entomology* 93, 26-30
- Andow, D.A. & Alstad, D.N. (1999) Credibility interval for rare resistance allele frequencies. *Journal of Economic Entomology* 92, 755-758
- Andow, D.A., Alstad, D.N., Pang, Y-H., Bolin, P.C. & Hutchison, W.D. (1998) Using F2 screen to search for resistance alleles to *Bacillus thuringiensis* in European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Economic Entomology* 91, 579-584
- Anglade, P., Stockel, J. & I.W.G.O. Cooperators (1984) Intraspecific sex-pheromone variability in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hbn. (Lepidoptera, Pyralidae). *Agronomie* 4, 183-187
- Babcock, K.W. & Vance, A.M. (1929) The corn borer in central europe. A review of investigation from 1924-1927. Technical Bulletin No. 135, Washington, D.C.
- Baker, A.J. (2000) *Molecular methods in Ecology*. Blackwell Science, Oxford
- Baker, M.D., Vossbrinck, C.R. Maddox, J.V. & Undeen, A.H. (1994) Phylogenetic Relationships among *Vairimorpha* and *Nosema* Species (Microspora) Based on Ribosomal RNA Sequence Data. *Journal of Invertebrate Pathology* 64, 100-106
- Bartsch, D. & Schuphan, I. (2000) Monitoring der ökologischen Auswirkungen insektenresistenter Kulturpflanzen mit rekombinanten *Bacillus thuringiensis* Toxin-Genen. In: Schiemann, J., Biologische Sicherheit - Proceedings zum BMBF-Statusseminar 29.-30. Juni 1999, BBA Braunschweig.
- Beck, S.D. (1982) *Insect Photoperiodism*, 2nd ed. Academic Press, New York

- Bing, L.A. & Lewis, L.C. (1993) Occurrence of the entomopathogen *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin in different tillage regimes and in *Zea mays* L. and virulence towards *Ostrinia nubilalis* (Hübner). *Agric. Ecosys. Environ.* 45, 147-156
- Bolin, P., Hutchison, W.D. & Andow, D.A. (1999) Long term selection for Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac Endotoxin in a Minnesota Population of European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Economic Entomology* 92, 1021-1030
- Bolin, P.C., Hutchison, W.D., Andow, D.A. & Ostlie, K.R. (1998) *Monitoring for European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) Resistance to Bacillus thuringiensis: Logistical Considerations When Sampling Larvae.* *Journal of Agricultural Entomology* 15, 231-238
- Bourguet, D., Bethenod, M.T., Pasteur, N. & Viard, F. (2000a) Gene flow in the European Corn Borer *Ostrinia nubilalis*: implications for the sustainability of transgenic insecticidal maize. *Proc R. Soc Lond. B* 267, 1-6
- Bourguet, D., Bethenod, M.T., Trouve, C. & Viard, F. (2000b) Host-plant diversity of the European Corn Borer *Ostrina nubilalis*: what value for sustainable transgenic insecticidal Bt maize? *Proc R. Soc Lond. B* 267, 1177-1184
- Bourguet, D., Chaufaux, J., Seguin, M., Buisson, C., Hinton, J. L., Stodola, T. J., Porter, P., Cronholm, G., Buschmann, L. L. & Andow, D. A. (2003) Frequency of alleles conferring resistance to Bt maize in French and US corn belt populations of the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis*. *Theoretical Applied Genetics* 106, 1225-1233
- Cabrita, L.F., Aksoy, U., Hepaksoy, S. & Leitao, J. M. (2001) Suitability of isozyme, RAPD and AFLP markers to assess genetic differences and relatedness among fig (*Ficus carica* L.) clones. *Scientia Horticulturae* 87, 261-273
- Cagan, L. (1998) Spring behaviour of the European Corn Borer, *Ostrina nubilalis* (Lepidoptera, Pyralidae) larvae in south-western Slovakia. *Biologia Bratislava* 53, 223-230
- Campbell, D., Duchesne, P. & Bernatchez, L. (2003) AFLP utility for population assignment studies: analytical investigation and empirical comparison with microsatellites. *Molecular Ecology* 12, 1979-1991
- Caprio, M.A. & Tabashnik, B.E (1992) Gene flow accelerates local adaptation among finite populations: simulating the evolution of insecticide resistance. *Journal of Economic Entomology* 85, 611-620
- Carrière, Y., Eilers-Kirk, C., Sisterton, M., Antilla, L., Whitlow, M., Dennehy, T.J. & Tabashnik, B.E. (2003) Long-term regional suppression of pink bollworm by *Bacillus thuringiensis* cotton. *PNAS* 100, 1519-1523
- Chapco, W., Ashton, N.W., Martel, R.K.B., Antonishyn, N. & Crosby W.L. (1992) A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of grasshoppers. *Genome* 35, 569-578

- Chaufaux, J., Seguin, M., Swanson, J.J., Bourguet, D. & Siegfried, B.D. (2001) Chronic Exposure of the European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) to Cry1Ab *Bacillus thuringiensis* Toxin. *Journal of Economic Entomology* 94, 1564-1570
- Chiueh, L., Chen, Y., Yu, J. & Shih, D. Y. (2000) Detection of Four Types of Genetically Modified Maize by Polymerase Chain Reaction and Immuno-Kit Methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 9, 50-57
- Christiansen, M. S. & Hancke, V. (1993) Gräser: Süßgräser, Sauergräser und Binsen. BLV Verlagsgesellschaft, München
- Cresswell, A., Sackville-Hamilton, N.R., Roy, A.K. & Viegas, B. (2001) Use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers to assess genetic diversity of *Lolium* species from Portugal. *Molecular Ecology* 10, 229-241
- Crickmore, N.; Zeigler, D.R., Feitelson, J., Schnepf, E., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J. & Dean, H. (1998) Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 807-813
- Davies, P.M. & Coleman S.B. (1997) European Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae) feeding behaviour and survival on transgenic corn containing Cry1A(b) protein from *Bacillus thuringiensis*. *J. Kans. Entomol. Soc.* 70, 31-38
- Degenhardt, H., Horstmann, F. & Mülleder, N. (2003) Bt-Mais in Deutschland. *Mais* 2, 75-77
- Encarta Virtual Globe (1999) Microsoft, Redmond, WA
- Engel, H. (1971) Tierische Schädlinge und ihre Bekämpfung. in: Rintelen: Mais - ein Handbuch der Produktionstechnik und Ökonomie. Bayrische Landesanstalt für Bodenkultur und Pflanzenbau, München
- EPA (2003) Environmental Protection Agency – Biopesticides. www.epa.gov/pesticides/biopesticides.htm (Stand: Mai 2003)
- EU-Draft Protocol for the monitoring of ECB resistance to Bt-Maize (1999) Monitoring regime. Minutes of the eleventh meeting of the SCP, Brussels, 4 February 1999
- Fadamiro, H.Y. & Baker, T.C. (1998) Reproductive performance and longevity of female European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis*: effects of multiple mating, delay in mating and adult feeding. *Journal of Insect Physiology* 45, 385-392
- Farinos, G.P., de la Poza, M., Hernandez-Crespo, P., Ortego, F. & Castanera, P. (2004) Resistance monitoring of field populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* and *Ostrinia nubilalis* after 5 years of Bt maize cultivation in Spain. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 110, 23-30
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, 783-791
- Franke, W. (1997) Nutzpflanzenkunde. Thieme Verlag, Stuttgart

- Ferre, J. & Van Rie, J. (2002) Biochemistry and Genetics of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 501-533
- Ferre, J., Real, M.D., Van Rie, J., Jansens, S. & Peferoen, M. (1991) Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in midgut membrane receptor. *Proc.Natl. Acad, Sci. USA* 88, 5119-5123
- Fitt, G., Andow, D., Carriere, Y., Moar, W., Schuler, T., Omoto, C., Kanya, J., Okech, M., Arama, P. & Maniania, N.K. (2003) Resistance risks and management associated with Bt maize in Kenya. In: *Risk Assessment of Transgenic Crops: A Case Study of Bt Maize in Kenya*, 1 December 2003
- Gilbert, K.G., Garton, S., Karam, M.A., Arnold, G.M., Karp, A., Edwards, K.J., Cooke, D.T. & Barker, J.H.A. (2002) A high degree of genetic diversity is revealed in *Isatis* spp. (dyer's woad) by amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Theoretical Applied Genetics* 104, 1150-1156
- Glare, T.R. & O'Callaghan (2000) *Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and safety*. Wiley Verlag, New York
- Gonzales-Nunez, M., Ortego, F. & Castanera, P. (2000) Susceptibility of Spanish Populations of the Corn Borers *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae) to a *Bacillus thuringiensis* Endotoxin. *Journal of Economic Entomology* 93, 459-463
- Goulao, L., Cabrita, L., Oliveira, C.M. & Leitao, J. M. (2001) Comparing RAPD and AFLP analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars. *Euphytica* 119, 259-270
- Gould, F. (1998) Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annu Rev Entomol* 43, 701-726
- Guse, C.A., Onstad, D.W., Buschman, L.L., Porter, P., Higgins, R.A., Sloderbreck, P.E., Cronholm, G.B. & Peairs, F.B. (2002) Modeling the development of resistance by stalk-boring lepidoptera (Crambidae) in areas with irrigated, transgenic corn. *Environmental Entomology* 31, 676-685
- Guthrie, W.D., Robbins, J.C. & Jarvis, J.L. (1985) *Ostrinia nubilalis*. In: Singh, P. & Moore, R.F. (Eds). *Handbook of Insect Rearing*. Vol. II, Elsevier Verlag, New York 407-413
- Hartl, D.L. & Clark, A.G. (1997) *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts
- Hawthorne, D.J. (2001) AFLP-Based Genetic Linkage Map of the Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata*: Sex Chromosomes and a Pyrethroid-Resistance Candidate Gene. *Genetics* 158, 695-700
- Haymer, D.S. (1994) Arbitrary (RAPD) primer sequences used in insect studies. *Insect Molecular Biology* 3, 191-194

- Hedrick, P.W. (2000) Genetics of Populations. Jones and Bartlett International, London
- Hennig, W. (1995) Genetik. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Heywood, V.H. (1993) Flowering Plants of the World. Oxford University Press
- High, S.M., Zaidi, M., Cohen, M.B., Shu, Q., Ye, G. & Altosaar, I. (2002) Tri-Toxin techniques for stem borers and pod borers: Pyramiding Bt genes. Proceedings of the VI International Conference on Bt (ICBt), Iguassu Falls, Brazil
- Hill, D.S. (1987) Agricultural insect pests of temperate regions and their control. Cambridge University Press
- Hillis, D.M. (1996) Inferring complex phylogenies. Nature 383, 130-131
- Höfte, H. & Whiteley, H.R. (1989) Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53, 242-255
- Huang, F., Higgins, R.A. & Buschman, L.L. (1997) Baseline Susceptibility and Changes in Susceptibility to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Under Selection Pressure in European Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae). Journal of Economic Entomology 90, 1137-1143
- Huang, F., Buschmann, L.L., Higgins, R.A. & McGaughey, W.H. (1999a) Inheritance of Resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European Corn Borer. Science 284, 965-967
- Huang, F., Zhu, K.Y., Buschmann, L.L., Higgins, R.A. & Oppert, B. (1999b) Comparison of Midgut Proteinases in *Bacillus thuringiensis*-susceptible and –resistant European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Pesticide Biochemistry and Physiology 65, 132-139
- Hudson, M. & LeRoux, E.J. (1986) Biology and population dynamics of the European Corn Borer (*Ostrinia nubilalis*) with special reference to sweet corn in Quebec. I. Systematics, morphology, geographical distribution, host range, economic importance. Phytoprotection 67, 39-54
- Hudson, M., LeRoux, E.J. & Harcourt, D.G. (1989) Seventy years of European Corn Borer (*Ostrinia nubilalis*) research in North America. Agric. Zool. Rev. 3, 53-96
- Hugger, H. (1998) Was ist von transgenen Maissorten zu erwarten? Mais 26, 112-113
- Hunt, T.E., Highley, L.G., Witkowski, J.F., Young, L.J. & Hellmich, R.L. (2001) Dispersal of Adult European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) Within and Proximal to Irrigated and Non-irrigated Corn. Journal of Economic Entomology 94, 1369-1377
- Ibelgauf, H. (1990) Gentechnologie von A bis Z. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Jaenicke-Despres, V., Buckler, E.S., Smith, B.D., Gilbert, M.T.P., Cooper, A., Doebley, J. & Pääbo, S. (2003) Early Allelic Selection in Maize as Revealed by Ancient DNA. Science 302, 1206-1208

- James, C. (2002) Global status of commercialized transgenic crops: 2002. ISAAA Briefs no. 27: Previews. ISAAA, Ithaca, NY.
- Janinhoff, A. (2003) Entwicklung des Maisanbaus in Deutschland. Mais 3, 110-111
- 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., Malcevshi, 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
- Karsholt, O. & Razowski, J. (Hrsg.) (1996) The Lepidoptera of Europe. A Distributional checklist. Apollo Books, Stenstrup
- Kluge, E.;ENZIAN, S. & Gutsche, V. (1999) Befallsatlas - Atlas der potentiellen Befallsgefährdung durch wichtige Schadorganismen im Ackerbau Deutschlands. Berlin, Braunschweig
- Klun, J.A. (1975) Insect Sex Pheromones: Intraspecific Pheromonal Variability of *Ostrinia nubilalis* in North America and Europe. Environmental Entomology 4, 891-894
- Koch, G. & Jung, C. (1997) Phylogenetic relationships of industrial chicory varieties revealed by RAPDs and AFLPs. Agronomie 17, 323-333
- Konstantopoulou, M.A., Krokos, F.D., Mazomenos, B.E. (2002) Chemical Stimuli from Corn Plants Affect Host Selection and Oviposition Behavior of *Sesamia nonagrioides*. Journal of Economic Entomology 95, 1289-1293
- Koziel, M., Beland, G., Bowman, C., Carozzi, N., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., Kadell, S., Launis, K., Lewis, K., Maddox, D., McPherson, K., Meghji, M., Merlin, E., Rhodes, R., Warren, G., Wright, M. & Evola, S. (1993) Field Performance of Elite Transgenic Maize Plants Expressing an Insecticidal Protein Derived from *Bacillus thuringiensis*. Bio/Technology 11, 194-200
- Langenbruch G.A. (1987) Maiszünslerbekämpfung im Silomais? Gesunde Pflanzen 39, 183-192
- Langenbruch, G.A. & Kleespies, R.G. (1998) Die Ausbreitung des Maiszünslers und die Verbreitung seiner Mikrosporidien. Mitt. der Biol. Bundesanstalt f. Land- u. Forstwirtschaft 357, 345
- Langenbruch, G.A. & Szewczyk, D. (1995) Maiszünsler (*Ostrinia nubilalis*) an Mais im Süden Nordrhein-Westfalens. Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst 47, 326
- Leahy, T.C. & Andow, D.A. (1994) Egg Weight, Fecundity and Longevity Are Increased by Adult Feeding in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Annals of the Entomological Society of America 87, 342-349

- 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. *Theoretical Applied Genetics* 102, 741-750
- Lereclus, D., Agaisse, H., Grandvalet, C., Salamiou, S. & Gominet, M. (2000) Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *Int. J. Med. Microbiol.* 290, 295-299
- Lewis, L.C. (1975) Natural regulation of crop pests in their indigenous ecosystems and in Iowa agrosystems: bioregulation of economic insect pests. *Iowa State J. Res.* 49, 435-445
- Lewis, L.C. & Lynch, R.E. (1970) Treatment of *Ostrinia nubilalis* larvae with Fumidil B to control infections caused by *Perezia pyraustea*. *Journal of Invertebrate Pathology* 15, 43-48
- Lin, J., Kuo, J. & Ma, J. (1999) Effect of different primer combinations on the resolution of AFLP in plants with small genome. *Focus* 18, 68-69
- Linn, C. E., Young, M. S., Gendle, M., Glover, T. J. & Roelofs, W. L. (1997) Sex pheromone blend discrimination in two races and hybrids of the European corn borer moth, *Ostrinia nubilalis*. *Phys. Entomol.* 22, 212-223
- Lopez, C., Sans, A., Asin, L. & Eizaguirre, M. (2001) Phenological Model for *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Environmental Entomology* 30, 23-30
- Lorenz, N. (1993) Untersuchung zur Verbreitung des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) in Beifuss (*Artemisia vulgaris* L.) und Mais (*Zea mays* L.), zur Überwinterung und Falterschlupf sowie zur Überwachung seiner Z-Rasse mittels Pheromonfallen. Dissertation Universität Göttingen
- Magg, T., Bohn, M., Klein, D. & Melchinger, A.E. (2002) Durch Bt-Mais weniger Mykotoxine? *Mais* 3, 98-101
- Magg, T., Melchinger, A.E., Klein, D. & Bohn, M. (2001) Comparison of Bt maize hybrids with their non-transgenic counterparts and commercial varieties for resistance to European Corn Borer and for agronomic traits. *Plant Breeding* 120, 397-403
- Malone, L. A. & Mclvor, C. A. (1993) Pulsed-Field Gel Electrophoresis of DNA from Four Microsporidian Isolates. *Journal of Invertebrate Pathology* 61, 203-205
- Marcon, P., Young, L.J., Steffey, K.L. & Siegfried, B. (1999a) Baseline susceptibility of European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* Toxins. *Journal of Economic Entomology* 92, 279-285
- Marcon, P., Taylor, D.B., Mason, C.E., Hellmich, R.L. & Siegfried, B.D. (1999b) Genetic Similarity Among Pheromone and Voltinism Races of *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Insect Molecular Biology* 8, 213-221

- Martel, C., Rejasse, A., Rousset, F., Bethenod, M. & Bourguet, D. (2003) Host-plant associated genetic differentiation in Northern French populations of the European Corn Borer. *Heredity* 90, 141-149
- Martienssen, R. (1997) The origin of maize branches out. *Nature* 386. 443-445
- Mastel, K. (2003) Wie anfällig ist Mais gegen *Fusarium*? *Mais* 3, 104-105
- McGaughey, W.H. & Whalon, M.E. (1992) Managing Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxins. *Science* 258, 1451-1455
- McKenzie, J.A. (1996) Ecological and Evolutionary Aspects of Insecticide Resistance. R.G. Landes Company and Academic Press, San Diego, California
- Mendelsohn, M., Kough, J., Vaituzis, Z. & Matthews, K. (2003) Are Bt crops safe? *Nature Biotechnology* 21, 1003-1009
- Meißner, H. (2002) Mais – Eine junge alte Kulturpflanze. *Mais* 4, 129-131
- Minnich, A.A. & Aronson, A.I. (1984) Regulation of protoxin synthesis in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology* 158, 447-454.
- Moar, W.J. & Schwartz, J. (2003) Workshop on the ethics, legal, and regulatory concerns of transgenic plants. *Journal of Invertebrate Pathology* 83, 91-92
- Morin, S., Biggs, R.W., Sisterson, M.S., Shriver, L., Eilers-Kirk, C., Higginson, D., Holley, D., Gahan, L.J., Heckel, D.G., Carriere, Y., Dennehy, T.J., Brown, J.K. & Tabashnik, B.E. (2003) Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *PNAS* 100, 5004-5009
- National Agricultural Statistics Service (2003) Agricultural Summary. www.usda.gov/nass (Stand: September 2003)
- Nei, M. (1972) Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106, 283
- Nei, M. (1978) *Molecular Population Genetics and Evolution*. Elsevier Verlag, New York
- Nei, M. & Li, W.H. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Si. USA* 76, 5269-5273
- Newton, C.R. & Graham, A. (1994) *PCR*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford
- Nordin, J.H., Cui, Z. & Yin, C.M. (1984) Cold-induced glycelor accumulation by *Ostrinia nubilalis* larvae is developmentally regulated. *Journal of Insect Physiology* 30, 563-566
- Obrycki, J.J., Giles, K.L. & Ormord, A.M. (1998) Interactions between an introduced and indigenous coccinellid species at different prey densities. *Oecologia* 117, 279-285
- Ohnesorge, B. (1992) Untersuchungen zur Populationsdynamik des Maiszünslers *Ostrinia nubilalis* Hbn. (Lep., Pyralidae) in Baden-Württemberg. III. Die Fluktuationen. *Journal of Applied Entomology* 113, 321-329

- Phoofolo, M.P., Obrycki, J.J. & Lewis, L.C. (2001) Quantitative Assessment of Biotic Mortality Factors of the European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) in Field Corn. *Journal of Economic Entomology* 94, 617-622
- Pierce, C.M.F., Solter, L.F. & Weinzierl, R.A. (2001) Interactions between *Nosema pyrausta* (Microsporidia: Nosematidae) and *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in the European Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology* 94, 1361-1368
- Pornkulwat, S., Skoda, S.R., Thomas, G.D. & Foster, J.E. (1998) Random Amplified Polymorphic DNA Used to Identify Genetic Variation in Ecotypes of the European Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 91, 719-725
- Ramachandran, S., Buntin, G.D., All, J.N., Raymer, P.L. & Stewart, C.N. (2000) Intraspecific Competition of an Insect-Resistant transgenic Canola in Seed Mixtures. *Agronomy Journal* 92, 368-374
- Rebourg, C., Chastanet, M., Gouesnard, B., Welcker, C., Dubreuil, P. & Charcosset, A. (2003) Maize introduction into Europe: the history reviewed in the light of molecular data. *Theoretical Applied Genetics* 106, 895-903
- Reineke, A., Karlovsky, P. & Zebitz, C.P.W. (1997) AFLP - Eine neue DNA-Fingerprinting-Methode zur Detektion von genetischer Variation bei Insekten. *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent* 11, 509-512
- Reineke, A., Karlovsky, P. & Zebitz, C.P.W. (1998) Preparation and purification of DNA from insects for AFLP analysis. *Insect Molecular Biology* 7, 95-99
- Ross, S.E. & Ostlie, K.R. (1990) Dispersal and survival of early instars of European Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae) in field corn. *Journal of Economic Entomology*, 83, 831-836
- Rossiter, M., Yendol, W.G. & Dubois, N.R. (1990) Resistance to *Bacillus thuringiensis* in gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae): genetic and environmental causes. *Journal of Economic Entomology* 83, 2211-2218
- Roush, R.T. (1994) Managing pests and their resistance to *Bacillus thuringiensis*: can transgenic crops be better than sprays? *Biocontrol Sci Tech* 4, 501-516
- Roush, R.T. & McKenzie, J.A. (1987) Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. *Ann. Rev. Entomol* 32, 361-380
- Russel, J.R., Fuller, J.D. & Macaulay, M. (1997) Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theoretical and Applied genetics* 95, 714-722
- Saeglitz, C. (1999) Freisetzung transgener Zuckerrüben (*Beta vulgaris* var. *altissima* Döll): Untersuchungen zur Auskreuzung durch Pollenflug. Diplomarbeit, RWTH – Aachen

- Saeglitz, C. & Bartsch, D. (2003) Regulatory and associated political issues with respect to Bt transgenic maize in the European Union. *Journal of Invertebrate Pathology* 83, 91-92
- Saeglitz, C., Schuphan, I., Bartsch, D. (2000). Konzept zur nachhaltigen Nutzung von Bt-Mais in Deutschland. *Verhandlungen der Gesellschaft für Ökologie* 30, 233
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.T., Higuchi, R., Horn, Mullis, K.B. & Ehrlich, H.A. (1988) Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491
- Saitou, N. & Nei, M. (1987) The Neighbour-Joining Method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425
- Schmitz, G., Rothmeier, I., Greib, G., Ross-Nickoll, M., Bartsch, D. (2002) Zum Ausbreitungsprozess und –potential des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) in Nordwestdeutschland. *Zeitschrift für Schädlingkunde und Pflanzenschutz* 6, 624-629
- Schmitz, G., Mücher, T., Saeglitz, C., Bartsch, D., Rothmeier, I., Mölle, J., Stanke, B. & Greib, G. (2001) Zur Ausbreitung des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) im südlichen Rheinland. *Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst*. 53, 63-64
- Schnepf, E., Crickmore, N., van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. & Dean, D.H. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 775-806
- Schuler, T.H., Poppy, G.M., Kerry, B.R. & Denholm, I. (1998) Insect-resistant transgenic plants. *TIBTECH* 16, 168-174
- Schuphan, I., Gathmann, A., Mause, R., Mücher, T., Roß-Nickoll, M., Saeglitz, C., Toschki, A. & Bartsch, D. (2002) Reflektion der bestehenden Sicherheitsforschung und des Monitoring am Beispiel Bt-Mais. In: Raubuch, M. & Schieferstein, B. *Ökologische und ökosystemanalytische Ansätze für das Monitoring von gentechnisch veränderten Organismen*. UBA Texte 44/02 – ISSN 0722-186X, 2002
- Sharma, A., Sharma, R. & Machii, H. (2000) Assessment of genetic diversity in a *Morus* germplasm collection using fluorescent-based AFLP markers. *Theoretic Applied Genetics* 101, 1049-1055
- Showers, W.B. (1993) Diversity and Variation of European Corn Borer Populations. in: Kim & McPherson: *Evolution of Insect pests; patterns of variation*. Verlag Wiley & Sons, New York
- Showers, W.B., Hellmich, R.L., Derrick-Robinson, M.E. & Hendrix W.H. (2001) Aggregation and dispersal behavior of marked and released European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) Adults. *Environ. Entomol.* 30, 700-710
- Showers, W.B., Witkowski, J.F., Mason, C.E., Calvin, D.D., Higgins, R.A., Dively, G.P. (1989) *European Corn Borer: Development and Management*. North Central Regional Extension Publication No. 327, Iowa State University, Ames, Iowa

- Siegfried, B.D. (2000) Bt transgenic plants for pest management. In: Proceedings of the 6th International Symposium on the Biosafety of Genetically Modified Organisms, July 2000, Saskatoon, Canada (Fairbairn, C., Scoles, G. & McHughen, A. Eds.) 133-119
- Siegfried, B.D., Spencer, T. & Nearman, J. (2000) Baseline susceptibility of the Corn Earworm (Lepidoptera: Noctuidae) to the Cry1Ab Toxin from *Bacillus thuringiensis*. Journal of Economic Entomology 93, 1265-1268
- Siegfried, B.D., Marcon, P., Witkowski, J.F., Wright, R.J. & Warren, G.W. (1995) Susceptibility of Field Populations of the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae), to *Bacillus thuringiensis* (Berliner). Journal of Agricultural Entomology 12, 267-273
- Smith, R.A. & Barry, J. W. (1998) Environmental persistence of *Bacillus thuringiensis* spores following aerial application. Journal of Invertebrate Pathology 71, 263-267
- Sneath, P.H.A. & Sokal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy, Freeman Verlag, San Francisco
- Solter, L.F., Onstad, D.W. & Maddox, J.V. (1990) Timing of disease-influenced processes in the life cycle of *Ostrinia nubilalis* infected with *Nosema pyraustea*. Journal of Invertebrate Pathology 575, 337-341
- Sourdis, J. & Nei, M. (1988) Relative efficiencies of the maximum parsimony and distancematrix methods in obtaining the correct phylogenetic tree. Mol. Biol. Evol. 5, 298-311
- Sparks, A.N., Chiang, H.C., Burkhardt, C.C., Fairchild, M.L. & Weekman, G.T. (1966) Evaluation of the influence of predation on corn borer populations. Journal of Economic Entomology 59, 104-107
- Stone T.B. & Sims S.R. (1993) Geographical susceptibility of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) to *Bacillus thuringiensis*. Journal of Economic Entomology 86, 989-994
- Streit, B. (1991) Lexikon Ökotoxikologie. VCH, Weinheim
- Swofford D.J. & Olsen G.J. (1996) in: Hillis, D.M. & Moritz, C. (eds.), Molecular Systematics. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Tabashnik, B.E. (1994) Evolution of Resistance to *Bacillus thuringiensis*. Annu. Rev. Entomol. 39, 47-79
- Tabashnik, B.E., Cushing, N.L., Finson, N & Johnson, M.W. (1990) Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamond back moth. Journal of Economic Entomology 83, 1671-1676
- Tabashnik, B.E., Liu, Y., Finson, N., Masson, L. & Heckel, D.G. (1997) One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. Proc. Natl. Sci. USA 94, 1640-1644

- Tabashnik, B.E., Finson, N., Groeters, F.R., Moar, W.J., Johnson, M.W., Luo, K. & Adang, M.J. (1994) Reversal of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Plutella xylostella*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 91, 4120-4124
- Thome, J., Gonzalez, D.O., Beebe, S. & Duque, M.C. (1996) AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. Crop Science 36, 1375-1384
- Toxrat (2003) Toxicity Response Analysis & Testing. ToxRat Solutions GmbH, Aachen
- Ubi, B.E., Fujimori, M., Ebina, M. & Komatsu, T. (2001) Amplified fragment length polymorphism analysis in diploid cultivars of rhodesgrass. Plant Breeding 120, 85-87
- Undeen, A.H. (1997) Microsporidia (Protozoa): A handbook of Biology and Research Techniques, Southern Cooperative Series Bulletin #387
- Van de Peer, Y. & de Wachter, R. (1994) TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft windows environment. Comput. Applic. Biosci. 10, 569-570
- Van Rie, J. (2000) *Bacillus thuringiensis* and its use in transgenic insect control technologies. Int. J. Med. Microbiol. 290, 463-469
- Voet, D. & Voet, J.G. Biochemie. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Vos, P. & Kuiper, M. (1998) AFLP analysis. in: Caetano-Anolles & Gresshoff, P.M. (eds): DNA markers – protocols, applications and overviews. John Wiley and Sons, New York. 115-131
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Freijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995) AFLP - a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23, 4407-4414
- Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. & Tingey, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18, 6531
- Wright, S. (1943) Isolation by distance. Genetics 28, 114-138
- Wührer, B. (2002) Fortschritte in der Maiszünslerbekämpfung. Mais 2, 80-83
- Wyniger, R. (1997) Insektenzucht. Methoden der Zucht und Haltung von Insekten und Milben im Laboratorium. Ulmer Verlag, Stuttgart
- Xu, M., Shao Sun, Wang, R. & Li, S. (1998) Genetic Variation and Phylogenetic Relationships Among Six Populations of Corn Borers in China. Biochemical Genetics 36, 289-297
- Yu, L., Berry, R.E. & Croft B.A. (1997) Effects of *Bacillus thuringiensis* in transgenic cotton and potato on *Folsomia candida* (Collembola: Isotomidae) and *Oppia nitens* (Acari: Oribatidae). Journal of Economic Entomology 90, 113-118
- Zahn, C. (2002) Molekularbiologische Untersuchungen zur genetischen Differenzierung des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis* Hübner). Diplomarbeit RWTH Aachen

- Zalucki, M.P., Clarke, A.R. & Malcolm, S.B. (2002) Ecology and Behavior of first instar larval Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 361-393
- Zellner, M. (2001) Maßnahmen gegen den Maiszünsler - Wirkungsweise und Erfolgsaussichten. *Maisinformation* 1, 3-5
- Zhu, J., Löfstedt, C. & Begtsson, B. O. (1996) Genetic Variation in the Strongly Canalized Sex Pheromone Communication System of the European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera; Pyralidae). *Genetics* 144, 757-766
- Zhu, J., Gale, M.D., Quarrie, S., Jackson, M.T., Bryan, G.J. (1998) AFLP markers for the study of rice biodiversity. *Theoretical and Applied Genetics* 96, 602-611
- Zimmermann, A., Hemmer, W., Liniger, M., Lüthy, J. & Pauli, U. (1998) A Sensitive Detection Method for Genetically Modified MaisGard Corn Using a Nested PCR-System. *Lebensm.-Wiss. U. Technol.* 31, 664-667
- Zoerb, A.C., Soencer, T., Hellmich, R.L., Wright, R.J. & Siegfried, B.D. (2003) Larval distribution and survival of second generation European Corn Borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Crambidae) on Event 176 Bt Corn. *Crop Protection* 22, 179-184

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Verschiedene Entwicklungsstadien des Mais.....	5
Abb. 2.2: Verschiedene Entwicklungsstadien des Maiszünslers (A: Eigelege, B: L5-Larve, C: männlicher Falter).....	7
Abb. 2.3: Schaden am Mais durch abgeknickte Stängel.....	9
Abb. 2.4: vereinfachter Wirkungsmechanismus des Cry-Toxins bei einer Lepidoterenlarve.....	12
Abb. 3.1 Karte der geographischen Lage der einzelnen Sammelstandorte für die verschiedenen Maiszünslerpopulationen.....	19
Abb. 3.2: Lichtfallen mit Fangkäfig (A) oder Fangnetz (B) zum Lebendfang von Maiszünslern und anschließendem Absammeln ihrer Eigelege.....	20
Abb. 3.3: Karte eines Sammelgebietes mit den drei Sammelstandorten (markiert mit einem blauen Quadrat) am Beispiel des Standortes Oberes Rheintal/Freiburg.....	21
Abb. 3.4.: λ -DNA Eco47 I-Marker mit Länge der einzelnen DNA-Fragmente.....	29
Abb. 3.5: Bandengröße und enthaltene DNA-Konzentration des Mengenstandards „smart-ladder“ zur Abschätzung von DNA-Konzentrationen im Agarosegel.....	33
Abb. 3.6: Einzelne Bandengrößen in Basenpaaren des Längenstandards zur Größenabschätzung der DNA-Fragmente im Gel.....	44
Abb. 3.7: Aufsicht auf die verwendeten Biotestplatten, die mit Medium befüllt sind und durch aufgeklebte Deckfolien verschlossen sind.....	55
Abb. 3.8: Die einzelnen Schritte der Testzubereitung: A: 1 ml des Nährmediums werden mit einer Spritze in die Vertiefungen gegeben. B: Die Larven werden einzeln mit Hilfe eines Pinsels in die mit Medium befüllten Vertiefungen der Testplatten gesetzt.....	57
Abb. 4.1: Restriktion von Gesamt-Maiszünslers-DNA mit den Enzymen EcoRI und Mse (Trul) bei verschiedenen DNA Konzentrationen von 5 μ g – 40 μ g DNA. -: Negativkontrolle (unverdaute DNA), M: Marker (DNA-ladder Eco 47/I).....	63
Abb. 4.2: Ausschnitt aus einem AFLP-Gel der Populationen Karlsruhe (K), Oderbruch (O) und Spanien (S) mit der Primerkombination E-AGG/ M-AGA. Es wurde jeweils die DNA von 10 weiblichen und 10 männlichen Tiere jeder Population verwendet. An beiden Seiten befindet sich der Längenstandard M (50-350 bp).....	65

- Abb. 4.3:** Dendrogramm erstellt mit Popgene nach der UPGMA-Methode. Die waagerechten Linien verdeutlichen maßstabsgetreu die ermittelten Längen aus der folgenden Tabelle 4.5.....69
- Abb. 4.4:** AFLP-Dendrogramm der UPGMA-Analyse mit bootstrap-Werten (grau); ♀/♂-Symbole kennzeichnen eine Auftrennung in männliche und weibliche Tiere.....72
- Abb. 4.5:** AFLP-Dendrogramm der Neighbour-Joining-Cluster-Analyse.....73
- Abb. 4.6:** RAPD-Gele mit Primer D 7 und jeweils 10 Männchen vom Standort Unteres Rheintal/Bonn Mais (A) und von *S.nonagrioides*. **M:** Größenmarker λ Eco 47/I, **BP:** Blindprobe.....74
- Abb. 4.7:** RAPD-Analyse: Dendrogramm nach der UPGMA-Methode basierend auf den genetischen Distanzen nach Nei (1978) unter Verwendung des Computerprogramms Popgene. Die waagerechten Linien verdeutlichen maßstabsgetreu die genetischen Distanzen aus Tab. 4.10.....78
- Abb. 4.8:** Dendrogramm vom Typ UPGMA der RAPD-Analyse mit bootstrap-Werten80
- Abb. 4.9:** RAPD-Dendrogramm nach NeighbourJoining-Methode mit Bootstrapwerten....82
- Abb. 4.10:** PCR Reaktion mit DNA aus Maisblättern. Proben 1-4: Maispflanzen mit Zünslerbefall aus der Bt-Variante; Proben 5-8: Maispflanzen aus nicht transgener (isogener) Anbauvariante; **+**: Positivkontrolle (MON 810); **Bp:** Blindprobe (Wasser); **M:** Marker (λ -DNA Eco 47/I).....89
- Abb. 4.11:** PCR von Kolbenproben der Maispflanzen des Versuchsfeldes. Proben 1 + 2: Maiskolben der nicht transgenen Anbauvariante, 3-10: Maiskolben-DNA der vier befallenen Pflanzen der Bt-Variante (Doppelansatz), **+**: Positivkontrollen aus Blattproben verschiedener transgener Pflanzen (MON 810) aus dem Gewächshaus, **-**: Negativkontrolle isogene, nicht transgene Maissorte aus dem Gewächshaus (Blattprobe), **Bp:** Blindprobe (Wasser); **M:** Marker (λ -DNA Eco 47/I).....90
- Abb. 4.12:** PCR-Nachweis auf Mikrosporidienbefall (oben) von Maiszünsler-DNA und spezifischer Nachweis der Gattung *Nosema* (unten). DNA von Maiszünslerlarven aus der Zucht: 1-6 Standort Karlsruhe, 9-12 Standort Bodensee, **-:** Negativkontrolle, **+**: Positivkontrolle, **Bp:** Blindprobe, **M:** Marker-DNA (ladder λ Eco 47/I). Die roten Pfeile kennzeichnen die spezifischen Amplifikationsprodukte der verwendeten Primer.....91
- Abb. 5.1:** Vorschläge für repräsentative Populationen, die aufgrund ihrer regionalen Verteilung in Europa geeignet sind für eine Überwachung einer möglicherweise auftretenden Resistenz gegenüber Bt-Toxin. Die unterschiedlichen Farben repräsentieren

die ökologischen Zonen, der dunklere Farbton verdeutlicht höhere Lagen. Die nördliche Verbreitungsgrenze wurde Schmitz et al. (2002) entnommen. Die Ökozonen Europas stammen aus Encarta Virtual Globe (1999).....107

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab 3.1: Übersicht über die einzelnen Standorte für die Sammlung von überwinternden L5-Larven.....	18
Tab. 3.2: Standorte der Lichtfallen.....	20
Tab. 3.3: Einstellungen der Klimaschränke für die Larvenaufzucht und die Haltung der Falter (modifiziert nach Wyninger 1997).....	22
Tab. 3.4: Bestandteile des Nährmediums zur Aufzucht von Maiszünslern.....	23
Tab. 3.5 : Verwendete Geräte und Chemikalien für die Insektenzucht.....	24
Tab. 3.6: Basensequenzen der Primer zum Nachweis von Mikrosporidien.....	26
Tab. 3.7: PCR Temperaturprogramm (NOSEMA).....	27
Tab. 3.8: Verwendete Chemikalien und Geräte für die PCR und Gelelektrophorese.....	30
Tab 3.9: Ursprung der für die AFLPs verwendeten DNA.....	37
Tab. 3.10: Auflistung der einzelnen Komponenten der Restriktion.....	38
Tab. 3.11: Basensequenzen der Adaptoren.....	39
Tab. 3.12: Übersicht der Bestandteile für die Ligation.....	40
Tab. 3.13: Basensequenzen der Primer für die Präamplifikation.....	40
Tab. 3.14: Bestandteile der Präamplifikation.....	41
Tab. 3.15: PCR-Bedingungen der Präamplifikation (Temperaturprogramm Nr. 3: PRÄAMPLIFIKATION).....	41
Tab. 3.16: Verwendete +3 Primer für die AFLP-Amplifikation (* IRD 700 markiert).....	42
Tab. 3.17: PCR-Komponenten der selektiven +3 – Amplifikation.....	43
Tab. 3.18: PCR-Bedingungen der zweiten AFLP-Amplifikation (Temperaturprogramm Nr. 4: AFLP).....	43
Tab. 3.19: Übersicht der in der RAPD-PCR untersuchten Individuen.....	48

Tab. 3.20: Einzelne Komponenten der RAPD-PCR beim Maiszünsler.....	49
Tab. 3.21: Sequenzen der verwendeten RAPD-Primer.....	49
Tab. 3.22: PCR-Bedingungen der RAPD-Reaktion (Temperaturprogramm Nr.2: RAPD)..	49
Tab. 3.23: Verwendete Geräte und Chemikalien für die molekulare Diversitätsuntersuchungen.....	50
Tab. 3.24: Für AFLP- und RAPD-Auswertung verwendete Computerprogramme.....	54
Tab. 3.25: In den Biotest verwendete Bt-Toxine.....	56
Tab. 3.26: Die Konzentrationsstufen des eingesetzten Toxins und die Anzahl der Testwiederholungen.....	58
Tab. 3.27: Für die Toxizitätstests verwendetes Material.....	59
Tab. 3.28: Basensequenz der Primer für den Nachweis von gentechnisch verändertem Mais (MON 810).....	61
Tab. 3.29: PCR Temperaturprogramm (MAIS1).....	62
Tab. 4.1: Anzahl der ausgewerteten Banden für jede der neun unterschiedlichen Primerkombinationen.....	64
Tab. 4.2: Shannon-Index (genetische Diversität) und Standardabweichung ermittelt auf Grund des AFLP-Bandenmusters. Der Shannon Index wurde zum einen soweit möglich für Männchen und Weibchen getrennt und zum anderen zusammen für Männchen und Weibchen angegeben.....	66
Tab. 4.3: Anzahl polymorpher Banden und Polymorphiegrad (PG) in % für die untersuchten Maiszünslerpopulationen nach AFLP Analyse.....	67
Tab. 4.4: AFLP-Analyse: Genetische Ähnlichkeiten (Werte über der Diagonalen) und genetische Distanzen (Werte unterhalb der Diagonalen) nach Nei (1972).....	68
Tab. 4.5: Relative Längen des Dendrogramms zwischen den Gruppen berechnet nach Nei (1978).....	70
Tab. 4.6: Anzahl der ausgewerteten Banden für jeden der acht Deca-Primer.....	74
Tab. 4.7: Polymorphiegrad (PG) der untersuchten Populationen in %: Angegeben sind die Anzahl der monomorphen und polymorphen Banden sowie der Polymorphiegrad (PG) in %.....	75
Tab. 4.8: Genetische Diversität (Shannon Index) auf Basis des RAPD-Fragmentmusters und die zugehörige Standardabweichung.....	76

- Tab. 4.9: RAPD-Analyse: Genetische Ähnlichkeiten (Werte über der Diagonalen) und genetische Distanzen (Werte unter der Diagonalen) der einzelnen Populationen nach Nei (1972).....77
- Tab. 4.10: Relative Distanzen des Dendrogramms zwischen den einzelnen Populationen/Gruppen berechnet nach Nei (1978).....79
- Tab. 4.11: Probit-Analyse zur Mortalität von Maiszünslern verschiedener Regionen gegenüber zwei verkürzten Cry1Ab-Toxinen von verschiedenen Herstellern, gemittelte LC_{50} -Werte mit Standardfehler (SE) der einzelnen Populationen, getestet unter Verwendung der Untermischmethode. Varianzanalyse: Monsanto Toxin: $F=9,41$, $n=49$, $p<0,001$; Neustadt Toxin $F=23,4$ $n=35$, $p<0,001$. Mittelwertvergleich mit Scheffe Test. Gleiche Buchstaben kennzeichnen homogene Gruppen.....84
- Tab. 4.12: Ergebnisse der Probit-Analyse zur Mortalität von Maiszünslern mit untergemischtem Monsanto-Toxin (truncated). Angegeben sind LC_{50} und LC_{90} Werte mit ihrem 95 % Koinfidenzintervall, Steigung des Probitmodell am Punkt LC_{50} , sowie das Ergebnis des χ^2 -Anpassungstests.....84
- Tab. 4.13: Vergleich der Mittelwerte der LC_{50} gegenüber verkürztem Cry1Ab-Toxin von Monsanto zwischen einer Freilandpopulation und einer Laborzucht derselben Herkunft. Angegeben ist der Standardfehler (SE) und die Anzahl der durchgeführten Tests.....85
- Tab. 4.14: Vergleich der Toxizitätswerte eines Protoxins mit einem kommerziellen Cry1Ac Produkt. Angegeben sind Mittelwerte der LC_{50} -Tests (Untermischmethode) mit Angabe des Standardfehlers (SE) und der Anzahl durchgeführter Testwiederholungen. Varianzanalyse Protoxin: $F=2,73$, $n=20$, $p=0,07$; MVP11 t-Test $t=1,13$, $n=16$, $p=0,279$. n.d. nicht durchgeführt.....86
- Tab. 4.15: Vergleich der gemittelten LC_{50} Wert (ng/cm^3) von zwei verschiedenen verkürzten (truncated) Bt-Toxinen (Oberflächenapplikation) für die verschiedenen Maiszünsler-Populationen. Angegeben sind Standardfehler (SE) und Testanzahl. Varianzanalyse Cry1Ab (Neustadt): $F=4,7$, $n=20$, $p=0,015$. Mittelwertvergleich mit Scheffe Test. Gleiche Buchstaben kennzeichnen homogene Gruppen. n.d. nicht durchgeführt.....87
- Tab. 4.16: LC_{50} Werte der auf Bt-Toxin-haltigen Futter selektionierten Maiszünsler mit Standardfehler (SE) und Anzahl der durchgeführten Testwiederholungen. Im Vergleich dazu die Werte eines Standorts (K) desselben Ursprungs ohne Selektionierung. t-Test: $t=6,77$, $n=17$, $p<0,001$88

8. Anhang

8.1 Basisdaten zur Analyse verwandtschaftlicher Beziehungen

8.1.1 AFLP 0/1-Matrix

254
25ACT 30AGA 40AGT 27ATA 21CAT 26CCA 24CTA 26CTG 35CTT

b1
001000001110010011011010100110110000011110101010110110010101011000101101001011010100001001000101010010001001111011111010
01100000111100101010101010100110011001111101010101001011100110101101101001111000110101011000111101110111101001000011001101011
01101011

b2
00100000111001001101101010011011000001111010101011110010101110110001111100111101010010100100010101100010011111011111010
01100000111100101010101010100110011111010101010010111101101011011010011110001101010110001111011101111001001100001001101110
11101011

b3
0010000011100100110110101001101100000111101010101111001010111110001111100101101010000100100010101100010011111011111010
0110000011010110101010101010011001111101000101001011110110101101101001111000110101011001111101110111001001100001011101110
01101011

b4
001000001110010011011010100110110000011110101011011001010111011000111110010110101001010010001010100100010011111011111010
011000001101011010101010101001100111110100000100101100110101101101001111000110101011001111101110101001001100011011101001
01101011

b5
0010000011100100110110101001101100000111101010110110010111110110001011110010110101001010010001010100100010011111011111010
0110000011010110101010101010011001111001000101001011100110101010101001111000110101011001110110111010100100110001100110101000
01101011

b6
001000001110010011011010100110110000011110101010010110010101110110001111010010110101001010010001110100100010011111011111010
0110000011110111111010101010011001111101000101001011100110101101101001111000110101011001110110111010100100110001100110101000
01101111

b7
001000001110010011011010100111110000111110101011011001010110111001111110011110101001010010001010100100010011111011111010
011000001110101111010101010100110011111010001010010111001101011011010011110001101010110011101101110111001001100001011101101
01101011

b8
00100000111001001101101010011011000001111010101011011001010110111001111110010110101001010010001010100100010011111011111010
0110000011010011101010101010011001111101010101001011101101011011010011110001101010110001101101110111001001100011001101101
01101011

b9
00100000111101001101101010011011000001111010101011011001011110010110101001010010001010100100010011111011111010
01100000110100111010101010101101111110101010010111001101011011001111000110101011001111101110111001001100101001101100
01101011

b10
00100000111001001101101010011011000001111010101011011001010110110001011010010110101000010010001010100100010011111011111010
01100000110100101010101010110011111010101010010111001101011011010011110001101010110001101101110111001001100011001101101
01101111

b11
00100000111001001101101010011011000001111010101011011001010111111001111010010110101011010010001010100100010011111011111010
01100000110100101010101010111001111101000101001011100110101101101001111000110101011001110110111011100100110000101111111
01101111

b12
001000001111010011011010100110110000011110101010101000101011011000111101001011010100100100010101100010011111011111010
0110000011010011101010101010011001111101000101001011100110101101101001111000110101011000111101110111001001100001001101001
01101111

b13
0010000011100100110110101001101100000111101010101010001010110110001011110010110101011010010001010100100010011111011111010
01100000111100111010101010100110011111010001010010111001101011011010011110001101010110011101101110111001001100011001101100
01101111

b14
00100000111001001101101010011011000001111010101111010001011110110001011110010110101001010010001010100100010011111011111010
0110000011010010101010101001101111101000101001011100110101101101001111000110101011000110110111011100100110010110110110
01101011

b15
001000001110010011011010100110110001011110101010101000101011011000111110011110101000010010001110100100010011111011111010
01100000110101111010101010100110011111010001010010111001101011111010011110001101010110011101101010111101001100001011101111
01101011

b16
0010000011100100110110101001101100000111101010101010001011110110001011010010110101000010010001010100100010011111011111010
011000001101001111101010101001100111110100010100101110011010111101001111000110101011001110110101011001001100101001101101
11101011

b17
00100000111001001101101010011011000001111010101001010001010110111001111110011110101010010010001010100100010011111011111010
0110000011010011101010101010011001111101000101001011100110101111101001111000110101011001111101000111001001100011001101111
11101111

b18
001000001110010011011010100110110000011110101010010100010101101100011110100101101010000100100010101100010011111011111010
01100000111001110101010101101111110101010100101110011010110110100111100010010110011111010101100100110001111101110
11101111

b19

00100000111001001101101001111100000111010100010100101111011000101110010110101000010010001010110001001111011111010
011000001101001111101010100110011001111101000101001011001101011010100111100011010101000110110101011100100110001101101011
11101111
b20
00100000111001001101101001101100000101101010001010010111011000101110010110101000010010001010110001001111011111010
0110000011010010101010100110011001111101000101001011101010110100111100011010101011001001100001011101001
11101111
f1
00000010001001001101100010010000000000100101000101010000111010001100011000111010101010011101000000000100101101111110
001000100111101011100001001011001111101010111000010010001011010100000000010101000111111110011100001000011001101001
01101111
f2
000000100010010011011000100100000000001001010001010100000110100011000010001110100001010011101000000000100101101111110
0010000001011010101000010010011001111101000101100001001000110110101000000000101100111111111000100000100000111101001
11101011
f3
000000100010010011011000100100000000001001010001010100001101000110001100011101000110100111010000000001001011011111111
0010000001011010101000010010110011111011001011100001001000011011010100000000010101000111111111000100000110000101111110
01101011
f4
00100010001001001101100010010000000010010111011100001011010001100001000111010001101001110100000000010010110111111111
00110000010110111011000010010011001111101100101110000100100001101101010000000001011000111111111001100000100000101101101
01101011
f5
0010001000100100110110001001000000001001010001010100001011010001100001000111010000101001110100000000010010110111111111
0010000001011010101000010010011001111101010111000010010000110110101000000010010111001111111110000100000100101101
01101011
f6
0000001000100100110110001001000000001001010001010100001011010101100001000111010000101001110100000000010010110111111111
00100000010110111110000100100110111110101010111000010010000110110101000000010010111001111111111000100000100000100111101
01101011
f7
00000010001001001101100010010000000000100101000101010000011010001100001000111010000101001110100000000010010110111111111
00100000010110111011000010010011001111101010101110000100100001101101010000000001011100111111111010011000001000011001101101
11101111
f8
0000001000100100110110001001000000000010010100010101000001101000110000100011100000101001110100000000010010110111111111
00110000011110101110000100100110011111010100011100001001000011011010100000000010111000111111110001100000100000111101111
11101111
f9
00000010001001001101100010010000000000100101000101010000011010001100011000111001000101001110100000000010010110111111111
00100000010110101111000010010011001111101000101110000100100001101101010000000001011000111111111001100000100001111101110
01101111
f10
00100010001001001101100010010000000010010110101110000011010001100011000111000001101001110100000000010010110111111111
00100000010110101010000100100110011111010001011100001001000011011010100000001001011100111111111001100000110000110111100
01101111
f11
00000010001001001101100010010000000000100101000101010000011010101100001000111010000101001110100000000010010110111111111
001000000101101010100001001001111101010101110000100100001101101010000000100101110011111111100011000001000001001111111
11101111
f12
000000100010010011011000100100000000001001010001010100001011010001101011000111000000101001110100000000010010110111111111
00100000010110101110000100100110011111010001011100010011001101010000000100101110001111111110011000001000011001101101
11101011
f13
00000010001001001101100010010000000000100101000101010000011010101100011000111000001010011101100000100010010110111111111
0010000001011010101000010010110011111010001011100001001100110101000000010010111000111111111001100000100010101101100
01101111
f14
0000001000100100110110001001000000000010010100010101000001101001100011000111010000101001110100000000010010110111111111
00100000010110111011000010010011111101110101110000100110001101101010000000001011100011111101001100000100000101101111
11101011
f15
000000100010010011011000100100000000001001010001010100000110101011011000110010000101001110100000000010010110111111111
00100000011110111011000010010011001111101010101110000100110011010100000000010111000111111101001110000100000100101111
01101011
f16
0000001000100100110110001001000000000010010100010101000001101000110001100100011010011101000001000010010110111111111
001000000101101010100001001001100111110101010111000010010000110110101000000000101110001111111111001100000100000101101111
01101111
f17
00100010001001001101101010010000000000100101000101110000011010001101001000110001000101001110100000000010010110111111111
00100000010110111011000010010110011111011010111000010010000110110101000000000011100011111110001100000100001111101111
01101111
f18
000000100010010011011000100100000000100101000101110000011010101100011000111000000101001110100000000010010110111111111
001000000101101111100001001011001111101010101110000100100001101101010000000001011100111111111001100000100000101101111
11101111
f19
000000100011010011011000100100000000001001010101110000011010001100011000111100001101001110100000000010010110111111111
00100010011110101110000100100110011111011101011100001001000011011010100000001001011100111111100001100000100010101101110
11101111
f20

000000100011010011011000100100000000001001010101110000001101110110000100011101000010001110100001000111010000000001001011011111111100
001100000111011101100001001001100111110100010111000010010001101101010000001000011110001111111100011000001000101011111100
111011111
h1
100110100011110011011111001000000000110010101011111000100001010000100001000011011100001001000100001011101101011011
00110000011101111100000100110110011111010001010001011001000011111010000010001001011000111101001010001011001101101001
111011111
h2
101110100111110011011001100100000000010100101010111100010000101000010010100001000110000100100010001001011101101111011
00110000011101100110000010011011001111101000101000100100001111101000001000100101100011110101010001011001110011100111111
111011111
h3
100110100111110011011001100100100000010100101010111100010000101000010010100011000010010001000100101110111010111010
00110000011101111100010100110110011111010001010001001000001111101000001000110101011001110110111101100000110011111010101
111011111
h4
1001101000111100110101110010010000001010010101011110001000011101001001010000100011000010010001000100101110111010111010
001100010111011111000001001101100111110100010100010010000111110100000100011010101100111110111101100000110010101111111
111011111
h5
10011010001111001101100110010000000001010010101011110001000010100001001010000100111000010010001000100101110111010111010
00110001011101110110000010011011001111101010100001011001000011111010000010001101010110001111011101100000110011111111111
111011111
h6
1001101000111100110110011001000000000101001010101111000100001010000110101001010011100001001000100010010111011101111010
0011000001110110111000001001101100111110100010100010010000011111010000010001101010110001111011010110000011001110111101
111011111
h7
100110100011110011011001100100000000011001010101111000100001010000100101000010011100001001000100010010111011101111010
0011000001110111110000010011110011111010001010001001000001111101000001000100101100111110100100110000110011110110111
111011111
h8
100110100011110011011001100100000000010100101010111100010000101000010010100111000010010001000100101110111010111010
00110000011101111100001100110110011111010001010001001000001111101000001000100101100111110100101100000110011110110111
111111111
h9
1001101000111100110110011001000000000110010101011110001000110100001001010010011100001001000100000010101110111010111010
00110000011101100110000110011011001111101010101000100100000111110100000100011010101100011110100010110000011001011110111
111011111
h10
101110100011110011011001100100000000011001010101111000100001110000110101001010001100001001000100010010111011101111010
0011000001110110111000001001111001111101000101000100100000111110100000100010010110011111011101100000110011111101101
111011111
h11
1011101000111100110110011001000000001100101010111100010000101010110010100100111000010010001000100001011110111010111011
0011000001111101110001110011011001111101000101000101100100001111101000001000110101011000111101110110000011001110110111
111011111
h12
1001101000111100110110011001000000000110010101011110001000010101011001010001100011000010010001000100001011110111010111011
001100100111111001100010100111100111110101010100010010000011111010000010001101010110001111101110111000011001110110111
111011111
h13
1001101000111100110110011001000000000101001010101111000100001010101100101000010011100001001000100010100101110111010111011
00110000011111111100000100110110011111010001010001001000001111101000001000100101100011111011100110000110011100111111
111111111
h14
10011010001111001101100110010000000001010010101011110001000010100001001010010011100001001000100010100101110111010111011
001100000111111111000001001101100111110101010100010010000011111010000010001001011000111110101100100000100010100111101
111011111
h15
1001101000111100110110011001000000000101001010101111000100001010000110101000010011100001001000100010000101110111010111010
001100000111011001100000100111100111110100010100010110010000111110100000100010010110011110111001000001000111001101101
111011111
h16
100110100011110011011001100100000000010100101010111100010000101010011010100111000010010001000100101110111010111010
0011000001110110011000001001101100111110100010100010010000011111010000010001001011000111110110101110000100011100110111
111011111
h17
10011010001111001101100110010000000001010010101011110001000011100001001010000100111000010010001000100101110111010111010
00110000011101110110000010011110011111010101010001001000001111101000001000110101011000111110110101110000110011100111111
111011111
h18
10011010001111001101100110010000000001010010101011110001000010101001001010000100111000010010001000100101110111010111011
0011000001110111011000001001111001111101000101000100100000111110100000100010010110011111011100110000100011111101111
111011111
h19
10011010001111001101100110010000000001010010101011110001000010101001001010000100111000010010001000100101110111010111011
0011000001110111110000010011110011111010101010001001000001111101000001000100101100011111011100110000100010111101111
111111111
h20
10011010001111001101100110010000000001010010101011110001000010101001001010000100111000010010001000100101110111010111011
001100000111011111000001001111001111101000101000101100100001111101000001000100101100011111011100110000100010111101111
111011111
k1
0010011010111110101100010010011000001011110101001011110000110110001111110000100100001010111110001000001100111101111011
0010000001110010101100101001001100111110101000100010010101001101100011100010000101100111110110001100010100011101101101
011011111

k2
001001101011110110110001001001100000101111010100101111000011011100111110000100100001010111101010000011100111101111011
001000000111001010110010100100110011110100000100010010101001101000111000100101011001111101100001001000011011101101
01101111

k3
00110110101101101101100010010011000001011110101001011110000110111001111100001001000010101111100010000011100111101111011
00100000011100101110010100101101111101010001000100101000011011000111000100101100111110110000010010110011101101111
01101111

k4
0011011010110110110110001001001100000101111010100101111000011011100111110000100100001010111100010000011100111101111011
0010000001110010101100001001011001111101000001000100101000011011010001100011000010110011111011100101001000011101101111
01101111

k5
0010011010110110110110011001001100000101111010100101111000011011100111110000100100001010111110001000001110111101111011
00100000011100101011000010110110011111010000010001001010000110110100011000010010110011111011100101001000011101101111
01101111

k6
00100110101101101101100010010110001011111010100101111000011011100111110000100100001010111110101000001110111101111011
0010000001110010101100001011011001111101000001000100101010011011000111000100001011001110110111001110010100011100101111
01101111

k7
00100110111101101101100010010011000001011110101010111110100111110011111000010010000101011110001000001110111101111011
001000000111001010110010100101100111110101000100010010101001101100011100010000101100111110111000110010110011100111111
01101111

k8
00100110101111001101100010010110000011111010101011111101101100111110010100100001010111110101000001110111101111011
001000000111001010110000100100110011111010010010001001010100110110001110001000010110011111010110111001010000111001101101
01101111

k9
0010011010111100110110001001001100000101111010101011111010011011000111010010100100001010111110001000001110111101111011
0010000001110010101100101001001100111110100100100010010100001101101000111000100001011001111101111011000101011001101111
01101111

k10
001101101011110011011000100101110000101111010101011110000110110001111100001001000010101111101010100011100111101111011
001000000111001011110000100100111111010100010001001010100110110100011100010010110011101101101100010111011100111101
01101111

k11
0010011010110100110110001001001100000101111010100101111000111010100111110000100100001010111110001000001110111101111011
00100000011100101010000010010011011111010110010001001010000110110100011100010010110011111010101110010110011110111101
01101111

k12
00100110101111001101100010010011000001111101010111111000011111001110010000100100001010011110001000001110111101111011
001000000111001010110000100101101111101000001000100101000011011010001100001001011001111101110011100101000111001101101
01101111

k13
0010011101101001101100110010011000001011110101001011110000110111001110010000100100001010011110001000001110111101111011
0010000001110010101100001001011001111101000001000100101000011011010001100001001011001111101110011100101000111001101101
01101111

k14
00100110101111001101100010010011000001111101010010111100001101110011100100001001000010100111110101000001110111101111011
001000000111001001110000100101101111101000001000100101000011011010001100001001011001111101100000100101100111101101111
01101111

k15
001001101010000110110001001001100000101111010101011110000110101001110010000100100001010011110001010001110111101111011
00100000011100101110000100101101111101000001000100101010011011000111000100101100111110110100010010000111001111111
01101111

k16
001001101011010011011000100100110000010111101010010111100001101010011100100001001000010100111100010000011100111101111011
001000000111001011100001001011001111101010001000100101000011011010001110011001010110001011001110011110111101
01101111

k17
00100111101101001101100010010011000011011110101010111100011101010011100100101001000010100111100010000011100111101111011
00100000011100101110000100101101111101001001000100101000011011010001110001001011001111101110001000101100111001101111
01101111

k18
0010011101101101100010010011000010111110101001011100001101010011101100001001000010100111101010000011100111101111011
00100000011100101111000010010011001111101000001000100101000011011010001110011001011001111101111011100101100111101101111
01101111

k19
00100111101101101100010010011000001011110101001011100100110110011101100001001001110111110101000001110111101111011
001000000111001010110000100100110011111010000010001001010000110110100011100010010110011101101110011001011001111111
01101111

k20
00100111101101101100010010011000001011110101001011100000110111001110010000100100001010011110001000001110111101111011
0010000001110010111000010010111110100000100010010100001101101000110001100101011001111101101010010100011100111101
01101111

o1
1100010000111100110110010101001100000101101010111100111011011100101001001000001000001011000100000000011001110010111011
0010000001110010111000111011001101111101000101000100100100110110100011100011000101100011110111111000001000111001100100
11101011

o2
1100010000011100110110010101001100000111101010111100011011011100101001001000001000011011000100000000011001111010111011
0010000001110010101000111011001100111110101010000000100100001101101000110001100010110011111011011100000100011100100
01101011

o3

1100010000011110110110110101001000000111101010101111000110111010100111001001000001000011011000100000000011001111010111011
001000000111001000100010101100110011111010101000001001000001101101000010000110001011001111101101110100001000011001101111
01101011
o4
1100010000011100110110110101001000000111101010101111100011011101110011101100100000100001100100010000000001101111010111011
001000000111001001100010101100110011111101110000000100100001101101000010000110001011000111010111110100001100011001100101
10101011
o5
110001000001111011011001010100100001011110101010111100111011110100100001001000001000011001000100000000011001111010111011
001000000111001011100010101100110011111101010000000100100001101101000111000110001011001110010101110100001100011011100100
11101011
o6
11000100001111011011001010100110001011110101010111100011011101110010000001000001000001001000101000000011001111010111011
00100000011100101010001010110011001111110001000000010010000110110100001101101000111001101100111110111110100001100011011100100
00101011
o7
1100010000111101101100101010111000011110101010111100111011101010010000001100001000001001000100000000011001111010111011
00100000011100101010001110110011001111001000100000001001000011011010000110001100010110011101100111101100001000001011100100
01101011
o8
110001000011111011011001010100110001011110101010111010001101110101001000010010000010000110010001010001000011001111010111011
00100000011100101010001010110011001111101000100000100100001101101000111000110011011000110110011110100000000001011100100
01100011
o9
11000100001111101101100101010011000001111010101011101000110111010100100001001100001100001001000101000000011001111010111011
00100000011100101010001010110011001111101000100000100100100001101101000011000110011011000110110011111100001100011001100100
11101011
o10
1100010010111110110110010101001100010111101010101110100011011101100100011001100001100001001000100000000011001111010111011
001000000111001011100010101100110011111010001000001001000011011010000110001100110110011110100010111000001000011001100100
01101011
o11
110001001011111011011001010100110000011110101010111010001101111010010000100101000110001100100010000000001101111010111011
00100000011100101010001010110011001111101000100000100100001101101000011000110011011001110110011111100001100001001100100
01101011
o12
110001001011111011011001010100110000011110101010111010001101110111011010010010100011000110010001000001000011001111010111011
001000000111001010100011101100110011111010101000000010010000110110100001100011001101100111111100001100001001100100
01101011
o13
110001001011111011011011010101110000011110101010111010001101110111001000010010100011000010010000100010100001101111010111011
001000000111001010100010101100110011111010001100000001001000011011010001110001100010110011101100001100001001100100
01101011
o14
11000100001111101101100101010011000001111010101011101001110111010001100001001000001100001001000010000000011001111010111011
001000000111001010100010100110011111100110000000100100001101101000011000110001011001110110001111100000000001011100100
00101011
o15
1100010000011110110110010101001100000111101010101110100011011111101100001011000011100011001000010000000011001111010111011
00100000011100101010001010110011001111101010100000001001000011011010001110001100010110011111000011100000100011001100100
00101011
o16
110001001001110011011001010100110000011110101010111100111011101010011100100110000110000100100001010001000011001111010111011
00100000011100101010001010110011001111101000100000001001000011011010000110001100010110011101100011101100001100011011100100
11101011
o17
111001001001110011011001010100110000011110101010111010011101110101011000010010000110000010010000101000000011001111010111011
00100000011100101010001010110011001111110001000000001001000011011010000110101100111001110010001111100000110000110011100100
11101011
o18
11000100001111101101100101010011000001111010101011101000110111010100100001001000001000001011000101000000011001111010111011
001000000111001011100010101100110011111010001000000010010000110110100001101011000101100111011000101100000101011001100100
11101011
o19
11000100001111101101100101010110000011110101010111010001101111010010000100110001100111101100010100000001101111010111011
001000000111001011100011101100110011111010001000000010010000110110100001101011001110010011110010000100011001100100
10101011
o20
11000100101010110110010101001100000111101010101111001110111010000100001001000001000001011000100000000011001111010111011
001000000111001010100010101100110011111100010000000100100001101101000111000110001011001110010011111100001100011001100100
00101011
s1
0000010101100111110110001011001100011101001010101111000101101000011101100010101010100111100100110001101111011111011
0010000001110010101100010010101001111000001100000001011000011011010000111010101011000110110111111001001101001011100101
01101011
s2
0000010101100111110110001011000100011101001010101111000001101000011101100010100010100101111100100110001101111101111011
0010010001110010101100001001010011110001011000000010110000110110100001010101011000111101111001101001101001011100111
11101111
s3
10000101011001111101100010110011000111010010101001011110000110100001110110000010001010101111100100110001101111101111011
001000000111001011110001001010011110001011000000010110000110110100011100110101011000111101111001001100110101110111
00101011
s4
001001010110011111011000101100110001110100101010010111100100110100011101100000100010100101111100100110001101111101111011
0010000001110010101100001001110100111100010110000000101100001101101000011100110101011000110110110110100110100101110101
11101011

s5
00000101011001111011000101100010001110100101001011110000110100001110110001010001011010111110010011000110111101111011
001000000111001010110000100101010111100011100000000101000011011010000101010101010001101101010010010010100101110111
10101011

s6
10000101011001111011000101100110001110100101001011110001110100001110110000010001010010111110010011000110111101111011
0010000001110010101100001001010100111100010110000000010100001101101000011101101010110001111010111100100100100101100101
10101011

s7
1000010101100111101100010110011000111010010100101111000001101000011101100010101010010111110010011000110111101111011
00100000011100101001000010010101001111000101100000000101000011011010001111011010101100011011010111100100100100101100111
00101011

s8
0000010101000111101100010110011000111010010100101111000001101000011101100000101010010111110010011000110111101111011
00100000011100101011000010010101001111000101101000100101000011011010001111011010101100011110111100110100100100101100111
01101111

s9
00000101010001111011001101100010001110100101001011110000110100001110110001010001010010111110010011000110111101111011
00100000011100101111000010010101011110001011010000001010000110110100001110110101011000110110111100010100100100101110111
11101111

s10
0000010101100111101101011001100011101001010010111100000110100001110110001010001010010111110010011000110111101111011
0010010001110010101100001001010100111100011101000000101000011011010001110011010101100011110111100100100100101101111
01101011

s11
000001010110011110110101011001100011101001010010111010101111000011101100010100010100100111110010011000110111101111011
00100000011100101011000010011101001111000101101000000101000011011010001111011010101100011110100110110100100100101100111
11101011

s12
0000010101100111101101010110000000111010010100101111000101111000011101100010100010100100111110010011000110111101111011
0010000001110010001100001001110100111100011110100000010100001101101000110110101011000111110100110110100100100101110111
01101011

s13
00000101011001111011010101100000001110100101001011110010111100001110110001010001010010111110010011000110111101111011
0010000001110010101100001001110101111000101101000000101000011011010000101111010101100011110101100010100100100101110111
11101011

s14
000001010110011110110101011000000011101001010010111100101111000011101100010100010100100111110010011000110111101111011
00100000011100101011000010011101001111000101101000000101000011011010000101111010101100011110101100010100100100101110111
11101011

s15
00000101011001111011010101100100001110100101001011110010111100001110110001010001010010011110010011000110111101111011
0010000001110010101100001001110101111000111101000000101000011011010000111111010101100011110101100010100100100101110111
11101011

s16
000001101100111101101010110010000111010010100101111000101111000011101100010100010100100111110010011000110111101111011
0010000001110010101000010011101001111000101101000000101000011011010001111011010101100011110111100100100100101110111
01101011

s17
0001011101000111101101010110000000111010010100101111000101111000011101100010100010100100111110010011000110111101111011
00100000011100101011000010011101001111000101101000000101000011011010000101010101011000111110101100110100100100101100111
11101011

s18
00010101010001111011010101100000001110100101001011110001011110000111011000101000101010011110010011000110111101111011
0010000001110010101100001001110100111100010110100000010100001111010000111011010101100011110101110110100100100101110111
11101011

s19
000101010100011110110101011000000011101001010010111100010111100001110110001010001010011011110010011000110111101111011
00100000011100101011000010011101001111000111101000000101000011110100011011010101100011110101110110100100100101110111
11101011

s20
000001010000011110110101011000000011101001010010111100010111100001110110001010001010011011110010011000110111101111001
00100000011100101011000010011101001111000101101000000101000011110100011011010101100011110110110110100100100101110111
11101011

e1
00101001101000011001100110010111100111110101010110100000010101000001110100010010000010111000111000001101110011101111011
001000000111101101110000010110011011111001000000000111101000011000010001100000100010110011100101100111100001100011001101111
11101111

e2
001010011010000110011001100101111001111110101010110100000010101000001110100010010000010111000111000001101000111010111011
0010000001110010111000001011001101111001000000000110110100001100001000110000010001011001110010110010100001100111011101111
11111111

e3
0010100110100101100110011001011110011111101010101101100000010101000111101000000100000101110001110000011010010111010111011
0010000001110010111000001011001100111001000000000110110100001100001000110000110001100111001011011010000100011011101111
10111111

e4
00001001101000011001100110010111100111111010101011011000000101010000011101000000100000101110101110000011010010111010111011
0010000001110010111000001011001100111100100000000011011010000110000100011010001000101100111001011011100001100011011101111
10111111

e5
000010011010000110011001100101111011111110101010110110000001101100011110100000010000010111000111000001101010111010111011
0010000001110010111000001011001100111100100000000011011010000110000100011010001000101100111001011011110000010001101101111
11111111

e6

00101001101000011001100110010111001111101010101101000000110100000110100000010000101110001100000110100011010111011
0010000001100101110000010110011001111000000000001101101000011000010001100001100010110011100101100100100000100011011101111
11111111
e7
0010100110100101100110011001011100111110101010110110000001101000001101000100100000101110001100000110100011010111011
0010000001100101110000010110011001110000000000011011010000110000100011000011000101100101001010010010000010001101101111
11111111
e8
0010100110100101100110011001011100111110101010110110000001101000011101000100100000101110001100000111100011010111011
00100000011001011100000101100110011100000000000110110100001100001000110100110001011001110010110011100001100011011101111
11101111
e9
00101001101001011001100110010111001111101010101101100000011010000011010001001000001011101011100000111100011010111011
001000000111010111000001011001100111001000000000110110100001100001000110000010001011001110010110110110000010001101101111
11101111
e10
00101001101001011001100110010111001111101010101101100000010101000111010000001000001011100011000001101000011010111011
001000000111001011100000101100110111100000000000110110100001100001000110100000001011001110010110111100001100011011101111
11111111
e11
00101001101001001001100110010111001111101010101101000000101010000011010000001000001011010111000001101000011010111011
001000000111001011100000101101110111100000000000110110100001100001000110100100001011001110010110110010000010011011101111
11111011
e12
0010100110100100100110011001011101111110101010110100000010101000011101000000100000101101000111000001101000011010111011
001000000111001011100000101101110111100000000000110110100001100001000110100000001011001110010110110010000010011011101111
11111011
e13
00101001101000001001100110010111011111101010101101100000010101000011101000000100000101101000111000001101100011010111011
00100000011100101110000010110111011110010000000001101101000011000010001100000000010110011100101101101100000100011011101111
11111011
e14
0010100110100000100110011001011101111110101010110110000001101000001101000000100000101101000111000001101100011010111011
0010000001110101110000010110011011110000000000011011010000110000100011000000000101100111001011011011100000100011011101111
10111011
e15
00101001101001001001100110010111001111101010101101100000011010000011101000000100000101101000111000001101100011010111011
0010000001110010111000001011001101111000000000001101101000011000010001101001100010110011100101101100100001100011011101111
10111011
e16
00101001101000001001100110010111001111110101010110110000001101000011101000110100000101101000111000001101100011010111011
0010000001110010111000001011001101111000000000001101101000011000010001100000000010110011100101110111100001100011001101111
11111011
e17
00101001101000001001100110010111001111101010101101100000011010000011010000010100000110000011010001110000110100011010111011
00100000011101011100000101100110111100000000000110110100001100001000110100100001011001110010111111100000100011011101111
11111011
e18
001010011010000010011001100101110011111101010101101100000011010000011101000110100000101101000111000001101100011010111011
0010000001110010111000001011001101111000000000001101101000011000010001101001000010110011100101110111100000100011011101111
11111011
e19
00101001101000001001100110010111001111110101010110110000001101000011101000010100000101101000111000001101100011010111011
001000000111001011100000101101110111100100000000111101010011000010001100001100010110011100101101110100001100111011101111
01111011
e20
00101001101000001001100110010111001111101010101101100000010101000011101000010100000101101000111000001101100011010111011
0010000001110010111000001011001101111000000000001101101000011000010001101001100010110011100101101110100000100011011101111
11111011
n1
00100000010100100100110011001001110001111101010100101000000110101000111010001100100010010111000101000000011000111011111011
0010000001110010111000001011001100111100000010000000100100001101001000010100000001011000110110110111010000101001101100101
11101011
n2
0010000001010100100110111001001100001111010101011010000001101010001110100011001000011101000101000000111000111011111011
00100000011101011100000101100110011100100010000000100100001101001000010100000001011000110110110110110000101001111111111
11101111
n3
0010000010100100100110011001001110001111101010100101100010011101110001110100011001000011101000101000000111000111011111011
001000000111001011100000101100110011110010101000000010010000110100100001000000001011000110110110111100001010001111111111
11101111
n4
0010000001110010010011001100100110000111110101010110100001001101110011110100011001000011101000101000000110000111011111011
0010000001110010111000001011001100111100000000000010010000110100100001000000001011000110110110111100001110011101101111
11101111
n5
00100000011100100100110111001001100000111101010100101100010011101110001110100011000010011111000101000000110000111011111011
001000000111001011100000101100110011110000000000000100100001101001000010000000010110001101101101101100001110011101101111
11101111
n6
001000000101001001001100110010011000001111010101011000100111010100011101000110000000111110001110000001111000111011111011
00100000011100101110000010110011001111001000000000100110100001101001000010100000001011000110110110110010000010001101101111
11111111
n7
00100000010110100100110011001001100000111101010100101100010011101010001110100011010000011111000101000001011000111011111011
00100000011110101110000010110011011110000001000000010010000110100100001000000001011000110110110110110000001001111101111
01101111

01001100000000110010110110000010011010000001010100010000000110000010000000110000110010000101000000010001000100000100110000
100011110000001101000100010000001000000100000101100000001010100101101000000010010100001100000001000000010110000001000000100
10000011
p10
01001100000000110010111110000010011010000001010100010000000110000010000000110000110010000101000000010001000100000100110000
100011110000001111010100110000001000000100000101100000001010100101101000000011010100001100000001000000010110000001000000100
10000011

8.1.2. RAPD 0/1-Matrix

62
Kw1
0101001001110101010101010001000001010110010110000100011110011
Kw2
01010000001100010100010101001100001000110010110000100010000011
Kw3
00010000000111110111010101011001000000100010100010100010000011
Kw4
0010110011001001011101010101011000010110010110010100011000011
Kw5
10000110010100111111010110011000000110101010110000100011000011
Kw6
00000000110110010111011101011010001001101010100011100010010011
Kw7
000000001001010101111010111011000000110010100011100011110011
Kw8
1110000001010101111001011100110100001011001010000100010000011
Kw9
1110000011001011011101010101000000011101010100001100010010011
Kw10
01100000110010110111010110001010001010100010100010100010000011
Km11
11111000000100110100010110011001000000111010101000100010100011
Km12
010000000000010111101010000100100101111001010000100010100011
Km13
01100100000000010111010110011001000011101010101001100011110011
Km14
11000000001100110111010111010001000000100010101010100011110011
Km15
011000000101100010111010101000001000000100010101001100011100011
Km16
101000001011000101100101010000010010001000101001100011110011
Km17
00010000100100010110010101001001001001110010111001100011110011
Km18
00010000100110110110010101001001001011110010111011100011100011
Km19
0110010010001001011101011100000000000100010101011100011100011
Km20
00100000101000010110010100011000000001101010101010100011110011
Fw1
11010000100100110111010101001010001011110010100110100011001011
Fw2
11101000010100010111000101011100000010100010100010100011001011
Fw3
010000000100000101010101011000000000101010100010100111000011
Fw4
0101000011011011011101010101100001000110010100001100110001011
Fw5
00110000011000000111010111011011001000100010100111100110000010
Fw6
1001000001100000111100011111011000000100010100110100111000011
Fw7
111000000000000011100010101011000001110010100110100010001011
Fw8
10010000001010011101010110001011001100100010100110100010001011
Fw9
11010100001010111111010101001011001110100010100110100111001011
Fw10
01000100110010110111011101001001000000110010100011100110001010
Fm11
00010000111100000111010110001011000000100011100111100010001011
Fm12
01010000011010010111010111001110001000100010100011100111011010
Fm13
01110000111000000111010100011100000000101011100011100110011011
Fm14
11010010100000110111010101001001000000100011100011100110011010
Fm15
010100000101000100101010110001010001100100011100011100011011010
Fm16
01011100100010110111011101111000000100010100111100011011011
Fm17
00000000110111110111010110011011000000100010100011100011011011
Fm18
01101000000000110111010101001100000000100010100111100011011011
Fm19
01000000100110000110010101001100001010101010100111100110001011
Fm20

1111000000000100110110101011011000000100010100011100010001010
Bw1
0010000011100101011101010111101001001100000100011101011100011
Bw2
0011100001000110111110101011001000001100000101011101011100011
Bw3
01010000110100010111010111100001101001100001110001101011100011
Bw4
000000001110001101110101010110011110111000101001101011000011
Bw5
0001000011000011011110100011000100001100011101011100011100011
Bw6
0000010011011000011110110111000001001100001110001101011100011
Bw7
01001000110000000111010100101101001100110011100010100011100010
Bw8
01010000010100110111010101100101000000101001100010100011100011
Bw9
01010000010100110111010111100001000000100001100001100011100011
Bw10
01111000110001110111010101011001001100011011101011101011100010
Bm11
00000000110001100111000101111001001101000000100010100011100011
Bm12
00010000110100100111000101110001010011000001110001000111100010
Bm13
00010000110110100111010101110000001001010010100000101011100010
Bm14
000100001110000001110101000100000010010100101000101011100011
Bm15
11010000000101010110010100111101100110101010100010100011100011
Bm16
01010000100100010111010101110001000000101010100000101011100011
Bm17
00000000010010001011101010111000000000101010100000101011100011
Bm18
10010001111011010111010100011001000101101010110010101011110011
Bm19
000100011110001111110101111000011010001000101000101011110011
Bm20
0001000011100001111101010111001101100100010110000100011110011
Ew1
00111100010000010111010111001101000100100110011100001011110111
Ew2
0101000001000001111101011100110010010010000001010001110010011
Ew3
0000100011000001011001010100100110010110011000100011111110011
Ew4
0011000011000101111001010100100110001110011000000000110010011
Ew5
0111000010000101111001010100100010001110011000000000110010111
Ew6
0010000010001001111101010100100110000011010011111000111110111
Ew7
0000110001000011011000011100100010000011010010000001111010111
Ew8
00111000000011010111010111001001000000110100101100101110110011
Ew9
001100000000101111110101010001100100110100111110101110110011
Ew10
001100000000101111110101010001000100110000111110101110110011
Em11
0001100000010011011101011100100100011110000101110011110010111
Em12
101000001000001101110111010010011001001001111111010101010111
Em13
00100000100000011111010101001101100100110001111110001011010111
Em14
00011100000001000111010101000100100100100101111110001011010111
Em15
10001000000100011111011110001001100001100111111110001011010111
Em16
01011000000100010111010111000001000100110101111110001011010111
Em17
01111000000000111111010111001101100110110101111110001111010111
Em18
01010000000011110111010101001001100100100101110110001011010111
Em19
0011010000000000111000010100000000000100001110110001011010111
Em20
01010100000011010111000111001001101000110101110110001011010111
Sw1
01101000110101110111110110011101010101100101101011100101100111
Sw2
01101000110101110111010110011101010101101101011100101101000
Sw3
0110100111000111011101011000100101100110110010100010010100001

Sw4
11010000010000110111010100011001010101110101101000101101000111
Sw5
01101000010100110111010100011001010001111101111000100101000100
Sw6
01111000010001110111010110001101010001111100101010100101101011
Sw7
01001001111000110111010100001101011001111101101000100101101011
Sw8
01000000111100110111010110001001010101111101101011100101101000
Sw9
01100000110000110111110100001101010101111101111001100101101111
Sw10
01111000110001110111110100001101010101110101111010100101101111
Sm11
01100000110110110111110111011001010001111101100000110101101010
Sm12
01101000100010110111010101001101010101110101110100110101101011
Sm13
01001000011110110111010101001101010101100101110001110101101011
Sm14
11001000101110110111010111001001010101101101100101110101101010
Sm15
01001000101110110111010101011001010001100101110001111100101010
Sm16
01101000111010110111010101001101010101101100110100110101101011
Sm17
01100001011110110111010101001101010101111101110101110100101011
Sm18
01000000111110110111010101001101010001111101100100110101101111
Sm19
01000000100010110111010101011101010101110101110100110101101111
Sm20
01101000101010110111010101011101010101110101100000110101101111
Sew1
00111000110010101100111001010010110000111000010110100011111101
Sew2
01111000101000001100110001010010110000111000010110100011111101
Sew3
01110000110010101100111001010010110000111000010110100011111101
Sew4
01111000101010101100100001010010110000111000010110100011111100
Sew5
01110000101010001100111001010010110000111000010110100011111100
Sew6
01111000101010001100110001010010110000111000010110100011111100
Sew7
01111000101010101100110001010010110000111000010110100011111100
Sew8
01111000111010101100110001010010110000111000010110100011110101
Sew9
01111000110010101100110001010010110000111000010110100011110101
Sew10
01110000101000001100110001010010110000111000010110100011110101
Sem11
01100000110010101100110001010010110000111000010110100011110101
Sem12
01101000110010001100110001010010110000111000010110100011110101
Sem13
01101000101010001100110001010010110000111000010110100011110101
Sem14
01100000101010001100110001010010110000111000010110100011110101
Sem15
01101000110010101100110001010010110000111000010110100011111101
Sem16
01101000100000001100110001010010110000111000010110100011110101
Sem17
01101000101010101100110001010010110000111000010110100011111101
Sem18
01101000100010101100110001010010110000111000010110100011110101
Sem19
01101000101010101100110001010010110000111000010110100011110101
Sem20
01101000110010101100110001010010110000111000010110100011110101

8.2 Basisdaten Toxizitätstests

8.2.1 Untermischmethode (UG)

Mortalitätsrate der Maiszünslerlarven bei Monsanto-Cry1Ab Toxin (truncated)

Freiburg*

Konz. in µg/g	Mortalität in %
2	92,97
1	81,25
0,5	65,63
0,1	50,78
0,05	44,54
0,025	35,94
0,012	28,91
0	8,98

Bonn

Konz. in µg/g	Mortalität in %
4	93,75
2	89,73
1	63,44
0,5	49,68
0,1	30,63
0,05	22,50
0,025	16,88
0,012	12,50
0	5,31

FreiburgL

Konz. in µg/g	Mortalität in %
2	96,25
1	84,37
0,5	75,94
0,1	64,94
0,05	49,06
0,025	35,81
0,012	26,57
0	13,35

Bodensee

Konz. in µg/g	Mortalität in %
8	98,80
2,7	95,62
0,9	90,21
0,3	84,27
0,1	61,04
0,05	49,87
0,025	30,34
0,012	17,71
0	15,29

Karlsruhe

Konz. in µg/g	Mortalität in %
8	98,95
2,7	98,18
0,9	91,90
0,3	74,25
0,1	54,86
0,05	45,03
0,025	28,94
0,012	15,67
0	10,96

Bodensee	LC 50	LC 10	LC 20	LC 90	
Montox					
B14		0,15	0,03	0,05	0,8
B13		0,1	0,01	0,02	1,25
B12		0,26	0,01	0,04	4,9
B11		0,05	0	0,01	1,38
B10		0,08	0,02	0,03	0,36
B8		0,03	0	0	0,66
B7		0,19	0,02	0,04	1,79
B6		0,09	0,01	0,02	0,68
B4		0,03	0	0	0,78
B2		0,18	0,02	0,05	2,22
µgToxin/g Futter					
Mittelwert		0,116	0,012	0,026	1,482
StaBW		0,07269113	0,00979796	0,01897367	1,26183042

Karlsruhe	LC 50	LC 10	LC 20	LC 90
<i>Montox</i>				
K1	0,16	0,03	0,06	0,74
K2	0,24	0,02	0,04	1,24
K3	0,1	0,02	0,03	0,59
K4	0,1	0,01	0,02	0,94
K5	0,04	0	0,01	0,67
K6	0,03	0	0,01	0,34
K7	0,26	0,04	0,07	1,81
K8	0,04	0,01	0,01	0,25
K9	0,12	0,01	0,03	0,96
K10	0,13	0,02	0,04	0,96
K11	0,13	0,02	0,04	0,9
K12	0,13	0,02	0,04	0,79
$\mu\text{gToxin/g Futter}$				
Mittelwert	0,12272727	0,01636364	0,03333333	0,85454545
StABW	0,07224842	0,01149919	0,01922751	0,42874235
SE	0,0205984	0,003	0,006	0,124

Laborgeneration

Freiburg	LC 50	LC 10	LC20	LC 90
Mon				
F1	0,11	0,01	0,02	2
F2	0,03	0	0	0,58
F3	0,04	0	0,01	0,4
F4	0,06	0,01	0,01	0,59
F5	0,04	0	0	0,47
F6	0,1	0,01	0,03	0,72
F7	0,22	0,01	0,03	4,7
F10	0,37	0,02	0,05	7,02
F9	0,1	0	0,01	5,1
F11	0,16	0,02	0,02	5,48
µgToxin/g Futter				
Mittelwert	0,123	0,008	0,018	2,706
StABW	0,10509784	0,00788811	0,01549193	2,57704051
SE				

Freiland

Freiburg 01	LC 50	LC 10	LC 20	LC 90
Mon				
F1	0,12	0	0,01	3,12
F2	0,15	0	0,01	5,67
F3	0,11	0,01	0,02	3,09
F4	0,1	0	0,01	2,92
µgToxin/g Futter				
Mittelwert	0,12	0,0025	0,0125	3,7
Stabw	0,02160247	0,005	0,005	1,31628264
SE				

Bonn	LC50	LC10	LC 20	LC90
Mon				
N1	0,24	0	0,02	12,45
N2	0,51	0,01	0,09	7,24
N3	0,16	0,01	0,02	3,56
N4	0,28	0,01	0,04	6,03
N5	0,53	0,06	0,12	4,94
N6	0,7	0,06	0,15	7,61
N7	0,25	0,02	0,04	4,27
N8	0,51	0,04	0,1	5,83
N9	0,41	0,05	0,1	3,64
N10	0,5	0,05	0,11	4,96
µgToxin/g Futter				
MW	0,409	0,031	0,079	6,053
Stabw	0,1701274	0,02330951	0,04557046	2,63428696
SE	0,054	0,007	0,014	0,83

Neustadt Toxin UG:

Freiburg	LC50	LC10	LC 20	LC90
JF1	0,43	0	0,02	61,12
JF2	1,94	0,09	0,27	39,57
JF3	1,85	0,18	0,4	18,97
JF4	1,28	0,09	0,22	18,44
JF5	1,72	0,13	0,31	23,08
JF6	2,06	0,2	0,44	21,28
µgToxin/g Futter				
Mittelwert	1,54666667	0,115	0,27666667	30,41
StabW	0,60964471	0,07231874	0,14975536	16,9602476
SE	0,25	0,03	0,061	6,93

Karlsruhe	LC50	LC10	LC 20	LC90	
JK1		0,65	0	0,01	10,1
JK2		0,92	0,08	0,19	10,05
JK3		1,65	0,11	0,27	25,52
JK4		2,28	0,15	0,39	34,14
JK5		1,83	0,14	0,33	24,69
JK6		2,11	0,22	0,47	20,67
µgToxin/g Futter					
Mittelwert	1,57333333	0,11666667	0,27666667	20,8616667	
SE	0,265	0,03	0,066	3,854	

Bodensee	LC50	LC10	LC20	LC90	
JB1		1,8	0,34	0,6	9,5
JB2		1,84	0,24	0,49	13,97
JB3		1,84	0,21	0,49	16,29
JB4		1,7	0,13	0,31	22,18
JB5		1,54	0,07	0,21	32,46
JB6		1,64	0,12	0,29	22,62
µgToxin/g Futter					
Mittelwert	1,72666667	0,09813256	0,39833333	19,5033333	
StABW	0,1217648	0,09813256	0,14998889	8,07172018	
SE	0,049	0,04	0,061	3,296	

Bonn	LC50	LC10	LC20	LC90	
<i>Jehletox</i>					
JN1		3,59	0,5	0,98	25,85
JN2		1,53	0,17	0,36	13,85
JN3		4,68	0,2	0,59	108
JN4		2,95	0,21	0,52	41,21
JN5		0,76	0,07	0,16	8,6
JN6		1,02	0,16	0,3	6,46
µgToxin/g Futter					
Mittelwert	2,42166667	0,21833333	0,485	33,995	
Stabw	1,56621093	0,14661742	0,28731516	38,4812696	
SE	0,64	0,06	0,117	15,71	

Anhang

Novartis Cry1Ab Protoxin

Karlsruhe	LC50	LC10	LC20	LC90	
Novartis/Prot.					
NK1		0,47	0,04	0,09	6,24
NK2		1,03	0,02	0,08	47,02
NK3		0,92	0,06	0,15	15,1
NK4		0,68	0,03	0,08	16,23
NK7		1,02	0,14	0,27	7,48
µg Toxin/g Futter					
Mittelwert		0,824	0,058	0,134	18,414
Stabw		0,21731084	0,04816638	0,07282857	16,5967943

Bodensee	LC50	LC10	LC20	LC90	
Nov/Protoxin					
NB1		1,16	0,3	0,47	4,51
NB2		0,92	0,26	0,4	3,31
NBod4		0,63	0,1	0,18	4,11
NB5		1,35	0,14	0,3	13,41
µg Toxin/g Futter					
Mittelwert		1,015	0,2	0,3375	6,335
Stabw		0,31118055	0,09521905	0,12606215	4,74297726
SE		0,156	0,0476	0,0063	2,3715

Freiburg	LC50	LC10	LC20	LC90	
Nov/Protox					
µg Toxin/g Futter					
NF1		2,47	0,73	1,11	8,38
NF2		1,56	0,36	0,60	6,71
NF3		0,87	0,41	0,55	5,98
µg/ml					
Mittelwert		1,63333333			
StabW		0,80251687			
SE		0,462			

8.2.2 Oberflächenapplikation (OA)

Neustadt-Toxin (Cry1Ab truncated)

OA	LC50 µg/Larve	µg/cm ²	ng/cm ²	LC10 µg/Larve	µg/cm ²	LC 20 µg/Larve	LC90
Karlsruhe							
OJK2	0,054	0,0305	30,5085	0,01	0,00564972	0,01	0,64
OJK3	0,053	0,0299	29,9435	0,01	0,00564972	0,02	0,35
OJK4	0,023	0,0130	12,9944	0	0	0,01	0,34
OJK5	0,053	0,0299	29,9435	0,01	0,00564972	0,02	0,63
OJK6	0,029	0,0164	16,3842	0,003	0,00169492	0,006	0,33
Mittelwert	0,0424	0,0240	23,9548	0,0066	0,00372881	0,0132	0,458
StabW	0,01512614	0,0085	8,5458	0,00477493	0,0026977	0,00641872	0,16753109
SE	0,007	0,0030	3,0000	0,002		0,003	0,075
Freiburg							
OJF1	0,051	0,0288	28,8136	0,01	0,00564972	0,01	0,47
OJF2	0,062	0,0350	35,0282	0,01	0,00564972	0,02	0,55
OJF3	0,039	0,0220	22,0339	0	0	0,01	0,64
OJF4	0,071	0,0401	40,1130	0,01	0,00564972	0,01	0,58
OJF5	0,088	0,0497	49,7175	0,01	0,00564972	0,01	1,65
Mittelwert	0,0622	0,0351	35,1412	0,008	0,00451977	0,012	0,778
StabW	0,01875367	0,0106	10,5953	0,00447214	0,00252663	0,00447214	0,49129421
SE	0,01	0,0040	4,0000	0,002	0,00112994	0,002	0,21
Bodensee							
OJB1	0,024	0,0136	13,5593	0,002	0,00112994	0,005	0,27
OJB2	0,031	0,0175	17,5141	0,004	0,00225989	0,007	0,27
OJB3	0,033	0,0186	18,6441	0,002	0,00112994	0,006	0,45
OJB4	0,027	0,0153	15,2542	0,003	0,00169492	0,006	0,28
OJB5	0,031	0,0175	17,5141	0,004	0,00225989	0,008	0,26
µg/Larve							
Mittelwert	0,0292	0,0165	16,4972	0,003	0,00169492	0,0064	0,306
Stabw	0,00363318	0,0021	2,0526	0,001	0,00056497	0,00114018	0,08080842
SE	0,002	0,0011	1,1299	0	0	0	0,036

Bonn N	LC50 µg/Larve	µg/cm ²	ng/cm ²	LC10 µg/Larve	µg/cm ² LC 20µg/Larve	LC90	
OJN1	0,042	0,0237	23,7288	0,007	0,0039548	0,013	0,247
OJN2	0,032	0,0181	18,1000	0,004	0,00226	0,008	0,268
OJN3	0,051	0,0288	28,8000	0,005	0,002825	0,011	0,533
OJN4	0,057	0,0322	32,2000	0,007	0,0039548	0,014	0,475
OJN5	0,072	0,0407	40,6779	0,01	0,0056497	0,019	0,538
µg/Larve							
Mittelwert	0,0508	0,0287	28,7013	0,0066			

Monsanto Cry1Ab-Toxin (truncated) OA

Freiburg F

MonsTox	LC50 µg/Larve	µg/cm ²	ng/cm ²	LC10µg/Larve	µg/cm ² LC 20µg/Larve	LC90	
OMF1	0,006	0,0034	3,3898	0,001	0,00056497	0,001	0,045
OMF2	0,002	0,0011	1,1299	0	0	0	0,099
OMF3	0,01	0,0056	5,6497	0,001	0,00056497	0,002	0,12
OMF4	0,008	0,0045	4,5198	0,001	0,00056497	0,002	0,08
OMF5	0,006	0,0034	3,3898	0,004	0,00225989	0,01	0,42
Mittelwert	0,0065	0,0037	3,6723	0,0014	0,00079096	0,003	0,1528
StabW	0,00341565	0,0019	1,9297	0,00151658	0,00085682	0,004	0,15189371
SE	0,006	0,0010	0,9500	0,001	0,00056497	0,002	0,068

8.3 Selektion mit toxinhaltigem (Cry1Ab) Futter

TOX Gen. 9-11	LC ₅₀ (µg/g)	LC ₁₀	LC ₂₀	LC ₉₀
<i>Mon-Toxin</i>				
T1	0,53	0,02	0,07	11,21
T3	1,82	0,01	0,07	276
T2	1,25	0,02	0,08	83,81
T4	1,23	0,05	0,15	29,84
T5	0,64	0,04	0,1	10,33
T6	1,01	0,04	0,12	24,89
T7	0,87	0,07	0,17	10,76
MW	1,05			
Stabw	0,40			
SE	0,15			

	LC ₅₀ (µg/g)	LC ₁₀	LC ₂₀	LC ₉₀
TOX Gen.18-20				
T8	0,86	0,27	0,4	2,77
T9	0,99	0,27	0,3	5,88
T10	1,15	0,05	0,15	25,99
MW	1,00	0,16	0,28	11,55
Stabw	1,15	0,11	0,13	12,60
SE	0,08	0,06	0,08	7,27

Danke...

.... Herrn Prof. Dr. Schuphan für die Bereitstellung des Themas, sein Interesse an dieser Arbeit und die Übernahme des Korreferates

.... Herrn PD Dr. Detlef Bartsch für die Betreuung während der Arbeit und besonders seinen nie endenden Optimismus und die ständige Motivation (ja Det, ich bin glücklich...!)

.... Dr. Achim Gathmann für die von Detlef geerbte Betreuung, die vielen Anregungen und die Hilfe besonders bei Fragen zur Statistik und meinem Computer

... Ute für ihr Verständnis, ihre Geduld und die Hilfe bei der Auswertung

.... Michaela, Ellen, Jenni, Mario, Angela, Claudia, Regina, Torsten, Kai und all den Hiwis, die viele Stunden in der Maiszünlserzucht verbringen mussten

... Ulrike für die vielen Gele und Sonja für ihre Hilfe bei allen Fragen zum Thema Sequenzierer

... Claudia Zahn für den gemeinsamen Spaß mit den AFLPs und bei anderen Dingen (wie war das noch mit der Konferenz in England...!)

... Kristine Holz für ihre Hilfsbereitschaft bei den vielen kleinen und großen Problemchen

.... Dr. Charles Vossbrinck für den netten e-mail-Kontakt und die Bereitstellung der Primersequenzen zum Mikrosporidiennachweis

... den Arbeitsgruppen Langenbruch und Hommel, sowie Wolfgang Bürgermeister der BBA Darmstadt, Kleinmachnow und Braunschweig für die gute Kooperation während des Projektes

.... Dr. Johannes Jehle für die Produktion und Bereitstellung des Cry1Ab-Toxins

... allen an den Maiszünlser sammelaktionen beteiligten Landwirten für ihre gute Zusammenarbeit und ihr Interesse

... Herrn Dannemann (Pflanzenschutzamt Freiburg) Herrn Hanselmann, Herrn Bischof und Herrn Schlegel (Amt für Landwirtschaft Karlsruhe), Herrn Greib (Pflanzenschutzamt Bonn) für die Hilfe

bei der Maiszünslersammlung und ganz besonders Herrn Boschert vom Bodensee für die exakten Wegbeschreibungen zu Feldern und Höfen und seine Unterstützung bei Sammel- und Fangaktionen

... Melanie und Björn für die Jagd auf Maiszünsler

... Jörg und Kai für die freundliche Vergiftung der kleinen Larven (ich weiß, das war nicht immer leicht...!)

... der gesamten Arbeitsgruppe für die Belebung des tristen Forschungsalltags

... Felix Ortego, Pedro Castanera und ihrer gesamten Arbeitsgruppe für die ersten Erfahrungen mit Toxtests, ihren Tipps und die freundliche Aufnahme in Madrid

... David Heckel für gute Ratschläge zu den AFLPs

... noch mal Kai, diesmal für die Fotos von den Maiszünslern

... Baghira für die vielen Spaziergänge mit mir, bei denen ich viel Zeit und Ruhe zum Nachdenken finden konnte

... Nico für seine vielen guten Ideen

... meinen Eltern

Diese Arbeit wurde gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF).

Lebenslauf

Name: Christiane Saeglitz
Geburtsdatum: 5.06.1971 in Wuppertal

Ausbildung:

28.05.1990 Abitur am Konrad-Heresbach Gymnasium
2.09.1991 Aufnahme der Ausbildung zur Biologisch-Technischen Assistentin an der Rheinischen Akademie in Köln
6.07.1993 Abschluss als Biologisch Technische Assistentin mit Zusatzqualifikation „Umweltschutz“
1.10.1993 Beginn des Studiums der Diplom-Biologie an der RWTH Aachen
4.05.1999 Abschluss des Studiums der Diplom-Biologie. Diplomarbeit: Freisetzung transgener Zuckerrüben (*Beta vulgaris* var. *altissima* DÖLL)-Untersuchungen zur Auskreuzung durch Pollenflug

Wissenschaftliche Tätigkeiten

1.02.1996 – 1.03. 1999 Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Biologie III (Pflanzenphysiologie)
1.09.1996 – 1.5.1998 Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Biologie VII (Entomologie)
1.06.1999 – 31.08.99 Wissenschaftliche Hilfskraft am Lehrstuhl für Biologie V
seit 1.09.1999 Wissenschaftliche Angestellte (Lehrstuhl Biologie V)
Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von PD Dr. Detlef Bartsch