

**Molekulargenetische Untersuchungen zur Abgrenzung von Populationen
des Maiszünslers *Ostrinia nubilalis* Hübner als eine Voraussetzung für
das Insektenresistenzmanagement (IRM) von *Bacillus thuringiensis*-Mais
(*Bt*-Mais)**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Naturwissenschaften
im Fachbereich Biologie

vorgelegt am Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie
der JUSTUS-LIEBIG-UNIVERSITÄT GIEßEN

von
Danila Liebe

Gießen, November 2004

Erstkorrektor: Frau Prof. Dr. T. Trenczek
Justus-Liebig-Universität Gießen
Institut für Allgemeine und Spezielle Zoologie
Fachbereich Biologie, Chemie und Geowissenschaften

Zweitkorrektor Prof. Dr. U. Burth
Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin und Braunschweig
Institut für integrierten Pflanzenschutz
Kleinmachnow

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	I
TABELLENVERZEICHNIS	IV
ARTVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Biologie, Schadwirkung und Bekämpfung des Maiszünslers <i>Ostrinia nubilalis</i>	1
1.1.1 Biologie von <i>O. nubilalis</i>	1
1.1.2 Schadwirkung von <i>O. nubilalis</i>	4
1.1.3 Bekämpfung von <i>O. nubilalis</i>	5
1.2 Maiszünslerresistenter <i>Bacillus thuringiensis</i> -(<i>Bt</i>) Mais	8
1.3 Insektenresistenzmanagement (IRM) von <i>Bt</i> -Mais	13
1.4 Genetische Charakterisierung von Insektenpopulationen	17
1.5 Zielsetzung	23
2 MATERIAL UND METHODEN	26
2.1 Herkunft der lokalen <i>O. nubilalis</i> -Populationen	26
2.2 Probenentnahme an den Standorten	34
2.3 Extraktion, fluorometrische Messung und Elektrophorese der DNA	37
2.3.1 Präparation der Larven und Extraktion von DNA	37
2.3.2 Fluorometrische DNA-Messung	38
2.3.3 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen	39
2.4 PCR-Techniken	40
2.4.1 Reaktionsbedingungen der RAPD-PCR	40
2.4.2 Aufnahme und statistische Auswertung der RAPD-Muster	44
2.4.2.1 Erstellung eines Dendrogramms	44
2.4.2.2 Validierung des Dendrogramme	46
2.4.2.3 Manteltest und F-Statistik	47
2.4.3 Reaktionsbedingungen der spezifischen PCR	49
2.4.3.1 Mais-DNA in der Template-DNA von <i>O. nubilalis</i>	49
2.4.3.2 ITS-1-Fragmente von <i>O. nubilalis</i>	50
2.4.4 RFLP-Analyse von ITS-1-Fragmenten	52
2.4.5 TGGE-Analyse von ITS-1-Fragmenten	53
2.4.6 Sequenzierung von ITS-1-Fragmenten	56
2.4.7 T-RFLP der <i>O. nubilalis</i> -assoziierten Mikroflora	57
3 ERGEBNISSE	61
3.1 DNA-Extraktion (Template-DNA)	61
3.2 RAPD-Analyse der genomischen DNA von <i>O. nubilalis</i>	64
3.2.1 Optimierung der Reaktionsbedingungen für die RAPD-PCR	64
3.2.2 Einfluss von Nichtziel-DNA auf die RAPD-Muster	69
3.2.2.1 Mais-DNA	70
3.2.2.2 Darmmikroben-DNA	71
3.2.2.3 Sonstige Nichtziel-DNA	72

3.2.3	Untersuchungen zur Zusammensetzung der Template-DNA	76
3.2.3.1	Einzeltier-DNA-Extrakte	76
3.2.3.2	Poolen von Einzeltier- DNA-Extrakten	79
3.2.3.3	Poolen von Einzeltieren vor der gemeinsamen DNA-Extraktion	81
3.2.3.4	Geschwisterlarven	83
3.2.3.5	Größe und Abstand der Sammelgebiete	87
3.3	Auswertung der RAPD-Muster für die Bewertung der genetischen Ähnlichkeit von lokalen <i>O. nubilalis</i> -Populationen der Z-Rasse	92
3.3.1	Vergleich von lokalen <i>O. nubilalis</i> -Populationen der Z-Rasse mit zwei Arten aus zwei anderen Gattungen der Familie Pyralidae sowie mit einer Mischung aus E- und Z-Rasse ..	93
3.3.2	Vergleich von mehreren deutschen Lokalpopulationen aus den Jahren 1999, 2000 und 2001 sowie die Validierung von zwei DNA- Proben aus einer Lokalpopulation	95
3.3.2.1	Jahr 1999	95
3.3.2.2	Jahr 2000	96
3.3.2.3	Jahr 2001	97
3.3.3	Vergleich von deutschen lokalen <i>O. nubilalis</i> Populationen über einen Zeitraum von zwei und drei Jahren	98
3.3.3.1	Clusteranalyse der Lokalpopulationen Oderbruch, Halle, Hessisches Ried, Niedernberg und Pocking über die Jahre 1999, 2000 und 2001	99
3.3.3.2	Clusteranalyse der Lokalpopulationen Oderbruch, Hessisches Ried und Pocking jeweils über die Jahre 1999, 2000 und 2001	101
3.3.3.3	Clusteranalyse der Lokalpopulationen Oderbruch, Halle, Hessisches Ried, Niedernberg, Pocking und Karlsruhe über die Jahre 2000 und 2001	104
3.3.3.4	Clusteranalyse von neun deutschen Lokalpopulationen mit jeweils einer 40er-Gruppe	104
3.3.4	Vergleich von deutschen Lokalpopulationen mit Lokalpopulationen aus Polen und Frankreich	106
3.3.5	Auswertung der RAPD-Muster auf populations- und gruppenspezifische DNA-Banden	107
3.3.6	Charakterisierung von Lokalpopulationen zu einer Gruppe	109
3.4	Analyse von ITS-1-Fragmenten der rDNA	115
3.4.1	Amplifikation von ITS-1-Fragmenten	115
3.4.2	Differenzierung von ITS-1-Fragmenten mittels RFLP	117
3.4.3	Differenzierung von ITS-1-Fragmenten durch die TGGE	118
3.4.4	Differenzierung von ITS-1-Fragmenten durch Sequenzierung	120
3.4.5	Versuche zur Differenzierung von Z- und E-Rasse mit ITS-1-spezifischen Primern	122
3.5	Populationsgenetische Analysen der mit <i>O. nubilalis</i> -assoziierten Darmmikroflora mittels T-RFLP	123
4	DISKUSSION	127
4.1	Optimierung der RAPD-PCR für populationsgenetische Erhebungen	127
4.1.1	Extraktion von DNA	127
4.1.2	Optimierung der Reaktionsbedingungen in der RAPD-PCR	128
4.1.3	PCR-Verunreinigungen mit Nichtziel-DNA	134

4.1.4	Reproduzierbarkeit der RAPD-Muster	135
4.2	Repräsentativität der Populationsstichprobe	136
4.2.1	Verunreinigungen der Template-DNA	136
4.2.1.1	Mais-DNA	136
4.2.1.2	Mikroben-DNA	137
4.2.2	Zusammensetzung der Template-DNA	138
4.2.2.1	Einzeltiere	138
4.2.2.2	Poolung von Einzeltieren	141
4.2.2.3	Variabilität durch Geschwister und bei Inzucht	142
4.2.2.4	Feldgröße, Auswahl des Feldbereiches und Entwicklungsstadium der Probanden bei der Probensammlung	143
4.2.2.5	Einfluss der DNA der E-Rasse auf die Template-DNA der Z-Rasse	145
4.2.3	Überprüfung der RAPD-Ergebnisse durch Nutzung weiterer DNA- analytischer Techniken	146
4.2.3.1	ITS-1-Fragmente von <i>O. nubilalis</i>	146
4.2.3.2	TGGE der ITS-1-Fragmente	148
4.2.3.3	Sequenzierung der ITS-1-Fragmente von Populationen der Z-Rasse	149
4.2.3.4	Vergleich der ITS-1-Sequenz von Einzeltieren und Tiergruppen	150
4.2.3.5	Vergleich der ITS-1-Sequenz von E- und Z-Rasse	150
4.2.3.6	Unterscheidung der E- und Z-Rasse anhand von möglichen Primern und Enzymen	152
4.2.3.7	Spezifische Primer zum Nachweis von <i>O. nubilalis</i>	153
4.2.3.8	T-RFLP der bakteriellen rDNA von <i>O. nubilalis</i>	153
4.3	Bedeutung der populations- und rassenspezifischen Analysen für die Abschätzung von Ursprung und Ausbreitung sowie der Gendrift von <i>O. nubilalis</i>	158
4.3.1	Art der Auswertung von RAPD-Mustern und ihre Validierung	158
4.3.2	Bewertung der RAPD-Ergebnisse in Bezug auf Rassenunterscheidung ...	159
4.3.3	Qualitative Bewertung der RAPD-Ergebnisse	160
4.3.4	Quantitative Bewertung der RAPD-Ergebnisse	160
4.3.5	Metapopulationen von <i>O. nubilalis</i>	166
4.3.6	Manteltest	170
4.4	Auswirkungen populationsgenetischer Kenntnisse auf das Insektenresistenzmanagement beim Anbau von <i>Bt</i> -Mais	173
5	ZUSAMMENFASSUNG	176
6	LITERATURVERZEICHNIS	179
7	ANHANG	195
1.	Standortbeschreibung	195
2.	Chemikalien und Geräte	198
3.	Puffer und Lösungen	201
4.	Alignment der <i>O. nubilalis</i> -Populationen.....	203
5.	T-RFLP-Originalläufe von <i>O. nubilalis</i> von verschiedenen Standorten mit jeweils einer Wiederholung von Oderbruch und Halle	206
6.	Primerauswertung über drei Jahre	207
7.	RAPD-PCR Gele von <i>O. nubilalis</i> aus den Jahren 1999, 2000 und 2001 mit den jeweiligen Lokalpopulationen und den Außengruppen <i>Ephestia kuehniella</i> und <i>Plodia interpunctella</i>	209
8.	Verweis auf Urtabellen	232

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 1 Entwicklungsstadien des Maiszünslers *O. nubilalis* Hübner
- Abb. 2 Sichtbare Schädigungen von Maispflanzen durch den Maiszünsler *O. nubilalis*
- Abb. 3 Verbreitung des Maiszünslers *O. nubilalis* in Deutschland
- Abb. 4 Geschädigtes Mitteldarmepithel einer *O. nubilalis*-Larve 30 Stunden nach Aufnahme des *Bt*-Toxins im Vergleich zu einer gesunden Larve
- Abb. 5 Durch Cry1Ab erkrankte Larve von *O. nubilalis* (Schlaffsucht)
- Abb. 6 Schema der RAPD-PCR
- Abb. 7 Intensität des Maisanbaus in Deutschland im Jahr 2003
- Abb. 8 Geografische Lage der ausgewählten 11 Sammelstandorte für *O. nubilalis*-Larven, davon neun in Deutschland, einer in Polen und einer in Frankreich
- Abb. 9 Mittleres Jahresklima an den deutschen *O. nubilalis*-Standorten in den Jahren 1999, 2000 und 2001
- Abb. 10 Lage und mit GPS ermittelte Entfernung der Sammelstellen am Standort Oderbruch in den Jahren 1999 (Golzow), 2000 (Seelow) und 2001 (Gusow)
- Abb. 11 Schematische Darstellung der ITS-Bereiche
- Abb. 12 Effekte von unabhängigen Extraktionen des selben Ausgangsmaterials aber unterschiedlicher Template-Menge auf die RAPD-Muster des Primers OPC-15
- Abb. 13 Einfluss von RNA auf die RAPD-Muster des Primers OPA-07
- Abb. 14 Reproduzierbarkeit der RAPD-Muster mit den Primern OPC-15, OPA-05, OPB-08
- Abb. 15 Effekte der Polymerasen Stoffelfragment und AmpliTaq mit und ohne Q-Solution auf die RAPD-Muster des Primers OPD-11
- Abb. 16 Effekte der Primerkonzentration auf die RAPD-Muster eines gering (Roth-A 16) und eines stark polymorphen Primers (Roth-A 03)
- Abb. 17 Stabilität der RAPD-Muster des Primers Roth-A 16 in Abhängigkeit von der Menge der Template-DNA und der Reproduzierbarkeit der PCR-Bedingungen
- Abb. 18 Effekt der Annealingtemperatur auf das RAPD-Muster des Primers Roth-A 16
- Abb. 19 Effekt der Touch-Down-PCR auf die RAPD-Muster der Primer Roth-A 03 und Roth-A 09
- Abb. 20 Spezifischer PCR-Nachweis von Mais-DNA mit den Primern hm3 und hm4 bei unterschiedlichen Mengen von Template-DNA
- Abb. 21 Spezifischer PCR-Nachweis von Mais-DNA mit den Primern hm3 und hm4 in der Template-DNA von L1-Larven und deren Fäzes
- Abb. 22 Einfluss der gewebespezifischen Herkunft von Ziel-DNA auf das RAPD-Muster der Primer OPA-07, OPF-03 und Roth 180-08
- Abb. 23 Bestimmung der optimalen Template-DNA für die Hauptuntersuchungen zur genetischen Ähnlichkeit der ausgewählten Lokalpopulationen von *O. nubilalis*
- Abb. 24 RAPD-Muster der Primer OPF-03, OPB-01, OPD-11 und Roth 180-08 von fünf Einzeltieren des Maiszünslers *O. nubilalis* aus vier Standorten
- Abb. 25 MVSP-basierte Auswertung der RAPD-Muster (Nei & Li-Koeffizient) von fünf Einzeltieren des Maiszünslers *O. nubilalis* von jeweils vier verschiedenen deutschen Standorten mit den Primern OPA-07, OPB-01,

- OPD-11, OPF-03, und Roth 180-08
- Abb. 26 RAPD-Muster der Primer Roth 180-08, OPA-07 und OPC-15 von verschiedenen Mischungen aus Einzeltier-DNA-Extrakten
- Abb. 27 RAPD-Muster der Primer OPA-07 und Roth 180-08 von Mischungen aus Einzeltier- und Tiergruppen-DNA-Extrakten
- Abb. 28 RAPD-Muster des Primers OPC-15 von DNA-Extrakten aus Tiergruppen und Mischungen von DNA-Extrakten aus Einzeltieren anhand des Primers OPC-15
- Abb. 29 RAPD-Muster der Primer Roth 180-08 und OPA-07 von verschiedenen Mischungen aus DNA-Extrakten von Tiergruppen (20 Tiere)
- Abb. 30 RAPD-Muster der Primer OPC-15 und OPF-03 von Geschwistern der F1 aus dem Feld, aus der F2 bis F3 einer einjährigen Zucht und aus einer Dauerzucht
- Abb. 31 RAPD-Muster der Primer OPC-15 und OPF-03 von Larven aus jeweils einem Maisstängel = Probe D
- Abb. 32 Darstellung der Feldbeprobung in Gusow (Oderbruch) und Spickendorf (Halle)
- Abb. 33 RAPD-Muster der Primer OPD-11, OPC-15 und OPF-03 von drei verschiedenen 20er-Tiergruppen vom Standort Gusow (Oderbruch), Teilfläche E
- Abb. 34 RAPD-Muster der Primer OPF-03 und OPC-15 von Teilpopulationen aus einzelnen Feldflächen und der Gesamtfläche eines Feldes an den Standorte Oderbruch und Halle
- Abb. 35 MVSP-basierte Auswertung der RAPD-Muster (Nei & Li-Koeffizient) von den Teilflächen- (A - E) und Gesamtflächenpopulationen (G) der Standorte Oderbruch und Halle aus dem Jahr 2001 mit den Primern OPC-15, OPD-11, OPF-03 und OPB-01
- Abb. 36 RAPD-Muster der Primer OPC-15 und OPF-03 von DNA-Extrakten aus 20 Tier-Proben aus zwei Gesamtflächen (G1,G2) bzw. fünf Teilflächen (A - E)
- Abb. 37 MVSP-basierte Auswertung der RAPD-Muster (Nei & Li-Koeffizient) von verschiedenen *O. nubilalis*-Populationen und Populationen der Außengruppen *Plodia interpunctella* und *Ephestia kuehniella* von zwei Jahren unter Angabe der Bootstrapwerte ≥ 50 (100 Wiederholungen)
- Abb. 38 MVSP-basierte Auswertung der RAPD-Muster (Nei & Li-Koeffizient) von allen untersuchten *O. nubilalis*-Standorten aus dem Jahr 1999 unter Angabe der Bootstrapwerte ≥ 50 (100 Wiederholungen) durch zwei Personen (Auswertung 1 & 2)
- Abb. 39 MVSP-basierte Auswertung der RAPD-Muster (Nei & Li-Koeffizient) von allen untersuchten *O. nubilalis*-Standorten aus dem Jahr 2000 unter Angabe der Bootstrapwerte ≥ 50 (100 Wiederholungen) durch zwei Personen (Auswertung 1 & 2)
- Abb. 40 MVSP-basierte Auswertung der RAPD-Muster (Nei & Li-Koeffizient) von allen untersuchten *O. nubilalis*-Standorten aus dem Jahr 2001 unter Angabe der Bootstrapwerte ≥ 50 (100 Wiederholungen) durch zwei Personen (Auswertung 1 & 2)
- Abb. 41 MVSP-basierte Auswertung der RAPD-Muster (Nei & Li-Koeffizient) von fünf *O. nubilalis*-Standorten über die Jahre 1999, 2000, 2001 unter Angabe der Bootstrapwerte ≥ 50 (100 Wiederholungen) durch zwei Personen (Auswertung 1 & 2)
- Abb. 42 Häufigkeiten der Bandenverteilung über alle *O. nubilalis*-Standorte aus

- den Jahren 1999, 2000 und 2001
- Abb. 43 MVSP-basierte Auswertung der RAPD-Muster (Nei & Li-Koeffizient) von drei *O. nubilalis*-Standorten mit jeweils drei Wiederholungen aus den Jahren 1999, 2000 und 2001 unter Angabe der Bootstrapwerte ≥ 50 (100 Wiederholungen)
- Abb. 44 MVSP-basierte Auswertung der RAPD-Muster (Nei & Li-Koeffizient) von sechs *O. nubilalis*-Standorten aus den Jahren 1999 und 2000 unter Angabe der Bootstrapwerte ≥ 50 (100 Wiederholungen) durch zwei Personen (Auswertung 1 & 2)
- Abb. 45 MVSP-basierte Auswertung der RAPD-Muster (Nei & Li-Koeffizient) von 40er-Gruppen des Maiszünslers *O. nubilalis* unter Angabe der Bootstrapwerte ≥ 50 (100 Wiederholungen) durch zwei Personen (Auswertung 1 & 2)
- Abb. 46 Amplifizierung der ITS-1-Fragmente von *O. nubilalis*, *Plodia interpunctella* und *Ephesia kuehniella*
- Abb. 47 RFLP von den ITS-1-Fragmenten der E- und Z-Rasse von *O. nubilalis* mit fünf Restriktionsenzymen
- Abb. 48 Spaltprodukte der ITS-1-Fragmente durch die Enzyme HaeIII und RsaI zwischen den Rassen Z und E und innerhalb einer Rasse zwischen den verschiedenen Standorten von *O. nubilalis*
- Abb. 49 Konformation der DNA-Doppelhelix und TGGE-Gel von den ITS-1-Fragmenten von *O. nubilalis* mit dem f-GC-Primer
- Abb. 50 Schematische Darstellung der Sequenzunterschiede im ITS-1-Bereich zwischen E- und Z-Rasse von *O. nubilalis*
- Abb. 51 Optimierung der Annealing-Temperatur von 60 °C – 68 °C für die Primer ecb.ez2f/2r zur Unterscheidung der Z- und E-Rasse von *O. nubilalis*
- Abb. 52 Bindung der beiden Primerpaare 8f und 926r bzw. 799f und 1492r auf der 16S rDNA
- Abb. 53 T-RFLP-Profil von der mit den Larven von *O. nubilalis* assoziierten bakteriellen 16S rDNA aus verschiedenen Larvenbereichen
- Abb. 54 Diagramm der T-RF-Profilen des 693 bp großen Fragments der bakteriellen 16S rDNA in der Template-DNA von *O. nubilalis* (8 Standorte) nach Spaltung mit dem Restriktionsenzym HhaI
- Abb. 55 Schematischer Vergleich der Nukleotidabfolge von der 18S rDNA zwischen MARCON et al. (1999) und den Ergebnissen aus dieser Arbeit (LIEBE)
- Abb. 56 Langjähriges Mittel der Hauptwindrichtung von den drei Befallsgebieten Oderbruch, Halle und Pocking des Maiszünslers *O. nubilalis* aus den Jahren 1991 bis 2001 der Monate Juni und Juli

TABELLENVERZEICHNIS

- Tab. 1 Zusammenstellung der für die Züchtung zur Verfügung stehenden *Bt*-Maiskonstrukte mit Resistenz gegen den Maiszünsler *O. nubilalis*
- Tab. 2 Maisanbau und potentielle *O. nubilalis*-Gefährdung der ausgewählten deutschen Standorte
- Tab. 3 Langjährige Temperatur- und Niederschlagsmittelwerte der Sammelstandorte unter besonderer Berücksichtigung der Monate Juni bis September für den Falterflug und die Larvenentwicklung sowie November bis Februar für die Diapause der Larven
- Tab. 4 Optimierte Reaktionsbedingungen der RAPD-PCR
- Tab. 5 Sequenz, G/C-Gehalt und Schmelztemperatur der 30 getesteten RAPD-Primer
- Tab. 6 Thermocycler-Programm für die RAPD-PCR auf einem PTC 200 (Heizdeckeltemperatur: 105 °C)
- Tab. 7 Sequenz, G/C-Gehalt und Schmelztemperatur der für Mais spezifischen Primer
- Tab. 8 PCR-Ansatz zum spezifischen Nachweis von Mais-DNA innerhalb der genomischen Template-DNA von *O. nubilalis*
- Tab. 9 Thermocycler-Programm der spezifischen PCR zum Nachweis von Mais-DNA auf einem PTC 200 (Heizdeckeltemperatur: 105 °C)
- Tab. 10 Sequenz, G/C-Gehalt und Schmelztemperatur der spezifischen Primer für die Amplifizierung des ITS-1-Bereiches
- Tab. 11 PCR-Ansatz zur Amplifikation der ITS-1-Region der rDNA
- Tab. 12 Thermocycler-Programm der PCR zur Amplifikation der ITS-1-Region auf einem PTC 200 (Heizdeckeltemperatur: 105 °C)
- Tab. 13 Charakterisierung und Konzentration der in der RFLP verwendeten Restriktionsenzyme (MBI Fermentas)
- Tab. 14 Reaktionskomponenten für die RFLP von DNA des Maiszünslers *O. nubilalis* mit den Enzymen RsaI und HaeIII
- Tab. 15 Sequenz, G/C-Gehalt und Schmelztemperatur der ITS-1-Primer mit GC-Klammer
- Tab. 16 PCR-Ansatz für das Cyclesequencing für lange Fragmente ab 300 bp
- Tab. 17 Sequenz, G/C-Gehalt und Schmelztemperatur der bakterienspezifischen Primer für die T-RFLP
- Tab. 18 PCR-Ansatz für die T-RFLP der bakteriellen rDNA
- Tab. 19 Thermocycler-Programm der PCR zur T-RFLP auf einem PTC 200 (Heizdeckeltemperatur: 105 °C)
- Tab. 20 Charakterisierung und Konzentration der verwendeten Restriktionsenzyme HhaI und TaqI
- Tab. 21 Reaktionskomponenten für die RFLP von bakterieller rDNA mit den Enzymen HhaI und TaqI
- Tab. 22 Fluorometrisch gemessene Template-DNA-Menge (5 µl) und entsprechende Elektrophorese-Banden von verschiedenen lokalen *O. nubilalis*-Populationen aus den Jahren 1999, 2000 und 2001 im Vergleich mit DNA anderer Herkunft
- Tab. 23 Bewertung der Nichtziel-DNA-Banden im Vergleich zu den *O. nubilalis*-Banden
- Tab. 24 Anteil gemeinsamer RAPD-Banden (F) von jeweils fünf Einzeltieren pro *O. nubilalis*-Standort mit den Primern OPA-07, OPB-01, OPD-11, OPF-03 und Roth 180-08
- Tab. 25 F-Statistik zwischen vier Lokalpopulationen von *O. nubilalis* (Einzeltier-DNA-Extrakte, fünf Primer)

- Tab. 26 Anteil gemeinsamer RAPD-Banden (F) von fünf Einzeltieren pro Geschwistergruppe (Primer OPC-15 und OPF-03)
- Tab. 27 a) Anteil gemeinsamer RAPD-Banden (F) von drei Einzeltieren pro Stängel (Primer OPC-15 und OPF-03); b) zur besseren Bewertung der MW von a) - Anteil gemeinsamer RAPD-Banden (F) von jeweils drei Geschwister-Larven aus dem Feld anhand der gleichen Primer
- Tab. 28 Anteil gemeinsamer RAPD-Banden (F) der 20er-Tiergruppen-DNA-Extrakte von verschiedenen Teilflächen der Standorte Oderbruch und Halle (Primer OPD-11, OPC-15 und OPF-03)
- Tab. 29 Anteil gemeinsamer RAPD-Banden (F) von zwei Gesamtflächen (G1, G2) und Teilflächen (A - E) des Standortes Gusow (Oderbruch) (Primer OPC-15 und OPF-03)
- Tab. 30 Ähnlichkeitskoeffizienten zwischen den einzelnen Teilflächen und in Beziehung zum Gesamtfeld Gusow (Oderbruch) (Primer OPC-15 und OPF-03)
- Tab. 31 Anteil gemeinsamer RAPD-Banden (F) der Primer OPB-01, OPF-03 und OPC-15 innerhalb und zwischen den 20-Tiergruppen-DNA-Extrakten der Lokalpopulationen Oderbruch, Hessisches Ried und Pocking mit jeweils drei Wiederholungen (1999, 2000, 2001)
- Tab. 32 F-Statistik zwischen den Lokalpopulationen Oderbruch, Hessisches Ried und Pocking von *O. nubilalis* anhand von Tiergruppen-DNA-Extrakten über die Jahre 1999, 2000 und 2001 von drei Primern (OPB-01, OPF-03 und OPC-15)
- Tab. 33 Zusammensetzung der DNA-Proben zu einem 40er-Tiergruppen-DNA-Extrakt (20 Larven/Jahr)
- Tab. 34 Prozentuale Polymorphiegrade der ausgewählten 20 RAPD-Primer über die Jahre 1999, 2000, 2001
- Tab. 35 Charakterisierung von diagnostischen Banden einzelner lokaler *O. nubilalis*-Populationen
- Tab. 36 Berechnung der Korrelation mittels Manteltest zwischen den Nei- und Li-Koeffizienten (Mittelwert der Auswertung 1 und 2) von der 40er-Gruppe der *O. nubilalis*-Standorte und ihre jeweiligen geographischen Distanzen in km (fett dargestellt)
- Tab. 37 Manteltest von acht und fünf Standorten mit jeweils acht verschiedenen Parametern bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$
- Tab. 38 Sequenz, G/C-Gehalt und Schmelztemperatur der ITS-1-spezifischen Primer
- Tab. 39 Anzahl und Länge der ITS-1-Restriktionsfragmente von MARCON et al. (1999) und den in der vorliegenden Arbeit
- Tab. 40 Übersicht der rDNA bei Pro- und Eukaryonten
- Tab. 41 F-Statistik von *Ostrinia nubilalis* – Vergleich der intra- und interpopulationsgenetischen Ähnlichkeit zwischen Einzeltieren aus einem Jahr und Tiergruppen aus drei Jahren basierend auf den Angaben in Tab. 24 und 31
- Tab. 42 F_{ST} -Werte aus RAPD-Untersuchungen verschiedener Insektenarten

ARTVERZEICHNIS

Artname	Erstbeschreiber	Reich	Ordnung	Familie
<i>Bacillus thuringiensis</i>	Berliner	Bakterien	Bacillales	Bacillaceae
<i>Escherichia coli</i>		Bakterien	Enterobacteriales	Enterobacteriales
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Bakterien	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae
<i>Thermus thermophilus</i>	Manaiia et al.	Bakterien	Thermales	Thermaceae
<i>Xanthomonas campestris</i>	Dowson	Bakterien	Xanthomonadales	Pseudomonaceae
<i>Artemisia vulgaris</i>	Linnaeus	Pflanzen	Asterales	Asteraceae
<i>Brassica napus</i>	Linnaeus	Pflanzen	Capparales	Brassicaceae
<i>Cannabis sativa</i>	Linnaeus	Pflanzen	Urticales	Cannabaceae
<i>Elymus caninus</i>	Linnaeus	Pflanzen	Cyperales	Poaceae
<i>Humulus lupulus</i>	Linnaeus	Pflanzen	Urticales	Cannabaceae
<i>Juniperus excelsa</i>	M.-Bieb	Pflanzen	Pinales	Cupressaceae
<i>Juniperus procera</i>	Hochst	Pflanzen	Pinales	Cupressaceae
<i>Picea glauca</i>	Moench	Pflanzen	Pinales	Pinaceae
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	Mirbe	Pflanzen	Pinales	Pinaceae
<i>Saccharum spontaneum</i>	Linnaeus	Pflanzen	Cyperales	Poaceae
<i>Zea mays</i>	Linnaeus	Pflanzen	Poales	Poaceae
<i>Alternaria dauci</i>	Groves & Skolko	Pilze	Hyphomycetales	Dematiaceae
<i>Aspergillus</i> spp.		Pilze	Eurotiales	Trichocomaceae

Artverzeichnis

Artname	Erstbeschreiber	Reich	Ordnung	Familie
<i>Beauveria bassiana</i>	Balsamo	Pilze	Hyphomycetales	Murorales
<i>Beauveria brongniartii</i>	(Saccardo) Petch	Pilze	Hyphomycetales	Murorales
<i>Hypoxylon truncatum</i>	Schwein.: Fr. J. H. Mill	Pilze	Xylariales	Xylariaceae
<i>Neurospora crassa</i>	Guénebaut	Pilze	Sordariales	Sordariaceae
<i>Penicillium</i> spp.		Pilze	Eurotiales	Trichomaceae
<i>Septoria tritici</i>	Roberge, Berk. & M.A. Curtis	Pilze	Pleosporales	Pleosporaceae
<i>Acropora</i> spp.		Tiere	Scleractinia	Acroporidae
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Harris	Tiere	Homoptera	Aphididae
<i>Aedes aegypti</i>	Linnaeus	Tiere	Diptera	Culicidae
<i>Aedes formosus</i>	Peckham	Tiere	Diptera	Culicidae
<i>Aeolothrips intermedius</i>	Bagnall	Tiere	Thysanoptera	Aeolothripidae
<i>Agapeta zoegana</i>	Linnaeus	Tiere	Lepidoptera	Cochylidae
<i>Agathis</i> spp.		Tiere	Hymenoptera	Braconidae
<i>Agriotes</i> spp.		Tiere	Coleoptera	Elateridae
<i>Agrotis segetum</i>	Denis & Schiffermüller	Tiere	Lepidoptera	Noctuidae
<i>Anopheles arabiensis</i>	Patton	Tiere	Diptera	Culicidae
<i>Anopheles gambiae</i>		Tiere	Diptera	Culicidae
<i>Anopheles nuneztovari</i>	Gabaldón	Tiere	Diptera	Culicidae
<i>Anthocharis sara</i> ,	Lucas	Tiere	Lepidoptera	Pieridae
<i>Anthonomus grandis</i>	Boheman	Tiere	Coleoptera	Curculionidae

Artverzeichnis

Artname	Erstbeschreiber	Reich	Ordnung	Familie
<i>Aphis gossypii</i>	Glover	Tiere	Homoptera	Aphididae
<i>Aporia crataegi</i>	Linnaeus	Tiere	Lepidoptera	Pieridae
<i>Attacus ricini</i>	Hutton	Tiere	Lepidoptera	Arctiidae
<i>Autographa californica</i>	Speyer	Tiere	Lepidoptera	Notuidae
<i>Bactrocera cucurbitae</i>	Coquillett	Tiere	Diptera	Tephritidae
<i>Bemisia tabaci</i>	Gennadius	Tiere	Homoptera	Aleyrodidae
<i>Boloria aquilonaris</i>	Stichel	Tiere	Lepidoptera	Nymphalidae
<i>Bombyx mori</i>	Linnaeus	Tiere	Lepidoptera	Bombycinae
<i>Cephus cinctus</i>	Norton	Tiere	Hymenoptera	Cephidae
<i>Chrysoperla carnea</i>	Sephens	Tiere	Neuroptera	Chrysopidae
<i>Coleomegilla maculata</i>	De Geer	Tiere	Coleoptera	Coccinellidae
<i>Daktulosphaira vitifoliae</i>	Fitch	Tiere	Homoptera	Phylloxeridae
<i>Danaus plexippus</i>	Linnaeus	Tiere	Lepidoptera	Nymphalidae
<i>Diabrotica barberi</i>	Smith & Lawrence	Tiere	Coleoptera	Chrysomelidae
<i>Diabrotica virgifera</i>	LeConte	Tiere	Coleoptera	Chrysomelidae
<i>Diaeretiella rapae</i>	McIntosh	Tiere	Hymenoptera	Braconidae
<i>Diprion pini</i>	Linnaeus	Tiere	Hymenoptera	Diprionidae
<i>Drosophila melanogaster</i>	Meig.	Tiere	Diptera	Drosophilidae
<i>Elatobium abietinum</i>	Walker	Tiere	Homoptera	Aphididae
<i>Encarsia formosa</i>	Gahan	Tiere	Hymenoptera	Aphelinidae

Artverzeichnis

Artname	Erstbeschreiber	Reich	Ordnung	Familie
<i>Ephestia kuehniella</i>	Zeller	Tiere	Lepidoptera	Pyralidae
<i>Epirrita</i> spp.		Tiere	Lepidoptera	Geometridae.
<i>Eretmocerus mundus</i>	Mercet	Tiere	Hymenoptera	Aphelinidae
<i>Eriborus terebrans</i>	Gravenhorst	Tiere	Hymenoptera	Ichneumonidae
<i>Euphydryas editha bayensis</i>	Sternitzky	Tiere	Lepidoptera	Nymphalidae
<i>Frankliniella occidentalis</i>	Pergande	Tiere	Thysanoptera	Thripidae
<i>Galleria mellonella</i>	Linnaeus	Tiere	Lepidoptera	Pyralidae
<i>Globodera</i> spp.		Tiere	Tylenchida	Heteroderidae
<i>Helicoverpa zea</i>	Boddie	Tiere	Lepidoptera	Noctuidae
<i>Heliothis virescens</i>	Fab.	Tiere	Lepidoptera	Noctuidae
<i>Hemileuca oliviae</i>	Cockerell	Tiere	Lepidoptera	Saturniidae
<i>Hyles lineata</i>	Hübner	Tiere	Lepidoptera	Sphingidae
<i>Inachis io</i>	Linnaeus	Tiere	Lepidoptera	Nymphalidae
<i>Lydella thompsoni</i>	Herting	Tiere	Diptera	Tachinidae
<i>Lymantria dispar</i>	Linnaeus	Tiere	Lepidoptera	Lymantriidae
<i>Macrocentrus grandii</i>	Goidanich	Tiere	Hymenoptera	Braconidae
<i>Marchalina hellenica</i>	Gennadius	Tiere	Homoptera	Margarodidae
<i>Melanargia galathea</i>	Linnaeus	Tiere	Lepidoptera	Satyridae
<i>Melanoplinae</i> spp.		Tiere	Orthoptera	Acrididae
<i>Meloidogyne chitwoodi</i>	Golden, O'Bannon, Santo & Finley	Tiere	Tylenchida	Heteroderidae

Artverzeichnis

Artname	Erstbeschreiber	Reich	Ordnung	Familie
<i>Naupactus leucoloma</i>	Boheman	Tiere	Coleoptera	Curculionidae
<i>Naupactus peregrinus</i>	Buchanan	Tiere	Coleoptera	Curculionidae
<i>Naupactus tucumanensis</i>		Tiere	Coleoptera	Curculionidae
<i>Nosema pyrausta</i>	Paillot	Tiere	Microspora	Nosematidae
<i>Oleria onega</i>	Hewitson	Tiere	Lepidoptera	Nymphalinae
<i>Orius insidiosus</i>	Say	Tiere	Heteroptera	Anthocoridae
<i>Orius majusculus</i>	Reuter	Tiere	Heteroptera	Anthocoridae
<i>Oscinella frit</i>	Linnaeus	Tiere	Diptera	Chloropidae
<i>Ostrinia nubilalis</i>	Hübner	Tiere	Lepidoptera	Pyralidae
<i>Parnassius bremeri</i>	Bremer	Tiere	Lepidoptera	Papilionidae
<i>Parnassius nomion</i>	Shaufuss	Tiere	Lepidoptera	Papilionidae
<i>Pediculus humanus</i>	Linnaeus	Tiere	Phthiraptera	Pediculidae
<i>Phyllocnistis citrella</i>	Stainton	Tiere	Lepidoptera	Gracillariidae
<i>Pieris brassicae</i>	Linnaeus	Tiere	Lepidoptera	Pieridae
<i>Pieris rapae</i>	Linnaeus	Tiere	Lepidoptera	Pieridae
<i>Platyptilia</i> sp.		Tiere	Lepidoptera	Pterophoridae
<i>Plodia interpunctella</i>	Hübner	Tiere	Lepidoptera	Pyralidae
<i>Plutella xylostella</i>	Linnaeus	Tiere	Lepidoptera	Plutellidae
<i>Podarcis muralis</i>	Laurenti	Tiere	Squamata	Lacertidae
<i>Prionoxystus robiniae</i>	Peck	Tiere	Lepidoptera	Cossidae

Artverzeichnis

Artname	Erstbeschreiber	Reich	Ordnung	Familie
<i>Proclrossiana eunomia</i>	Esper	Tiere	Lepidoptera	Nymphalidae
<i>Pseudomonas</i> spp.		Tiere	Eubacteriales	Pseudomonaceae
<i>Rachiplusia ou</i>	Guenée	Tiere	Lepidoptera	Noctuidae
<i>Sitobion avenae</i>	Fabricius	Tiere	Homoptera	Aphididae
<i>Spodoptera frugiperda</i>	JE Smith	Tiere	Lepidoptera	Noctuidae
<i>Thrips tabaci</i>	Lindeman	Tiere	Thysanoptera	Thripidae
<i>Trialeurodes vaporariorum</i>	Westwood	Tiere	Homoptera	Aleyrodidae
<i>Trichogramma</i> spp.		Tiere	Hymenoptera	Chalcidoidea
<i>Trioxys pallidus</i>	Haliday	Tiere	Hymenoptera	Aphidiidae
		Tiere;		
<i>Vairimorpha necatrix</i>	Kramer	Protozoa	Microsporida	Burenellidae

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Beschreibung
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
BBA	Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin und Braunschweig
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
C	Cytosin
ca.	circa
CCM	Corn Cob Mix
Cry	crystal (Toxinkristall)
CsCl	Zäsiumchlorid
dNTP	2'-Desoxynukleotid-5'- Triphosphat
ddNTP	2',3'-Dideoxynucleotid- Triphosphat
dd Wasser	doppelt destilliertes Wasser
DGGE	Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECB	European Corn Borer (Maiszünsler)
ecb.ez.	European Corn Borer (Maiszünsler); E- und Z-Rasse
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
ETS	External Transcribed Spacer
f	forward
F	Anteil gemeinsamer RAPD-Banden
F1, F2, ...	Anzahl der Generationen (im Labor)
FISH	Floureszenz in situ Hybridisierung
F _{ST}	Fixierungsindex
G	Guanin; Gruppe
H	Heterozygotität
HCl	Salzsäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR	Hessisches Ried
H _S	durchschnittliche HWG-Heterozygotität aller Organismen in einer zufällig paarenden Subpopulation bzw. Lokalpopulation
H _T	durchschnittliche Heterozygotität aller Individuen der gesamten Art
HWG	Hardy-Weinberg-Gleichgewicht
IGS	Inter Genetic Spacer
IRM	Insekten-Resistenz-Management
ITS	Internal Transcribed Spacer

K	Nukleotid T oder G
KAc	Kaliumacetat
Konz.	Konzentration
L	(Loci) Anzahl der polymorphen Banden
L ₁ , L ₂ ... L ₅	Erstes, zweites ...fünftes Entwicklungsstadium
LC ₅₀	letale Konzentration, bei der 50 % der Versuchstiere sterben
Lsg.	Lösung
M	Nukleotid A oder C; Marker
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Mio	Million
mt-DNA	mitochondriale DNA
MVSP	MultiVariate Statistical Package
MW	Mittelwert
N	Anzahl der Individuen (Proben)
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NEPTUN	Netzwerk zur Ermittlung des Pflanzenschutzmitteleinsatzes in unterschiedlichen, landwirtschaftlich relevanten Naturräumen Deutschlands
Nied.	Niederschlag
Nm	Anzahl migrierende Individuen
P	Signifikanz
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAT	<i>Phosphinothricin-Acetyl-Transferase</i>
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase Chain Reaktion (Polymerase-Kettenreaktion)
pers. Mitt.	Persönliche Mitteilung
pH	Pondus hydrogenii
r	Korrelationskoeffizient; reverse
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
rDNA	ribosomale DNA
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transcriptase-PCR
RWTH	Rheinisch Westfälische Technische Hochschule
SAS	Statistical Analysis System
SD	Standard deviation (Standardabweichung-Stichprobe)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphic
SSO	Sequence-Specific Oligonucleotides
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-acetate-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

Temp.	Temperatur
TGGE	Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese
T _m	Schmelztemperatur
TNE	Tris-Natrium-EDTA
T-RFLP	Terminale-RFLP
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSR	Template Suppression Reagent
U	Unit (Einheit); Umdrehungen
UPGMA	Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages
UV	Ultraviolettes Licht
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
W	Nukleotid A oder T
Y	Nukleotid C oder T
z. B.	zum Beispiel

Einheiten und metrische Präfixe

°C	Grad Celsius
g	Gramm; Erdbeschleunigung
h	Stunde
ha	Hektar
M	Molarität
m	Meter
mol	Stoffmenge
qm	Quadratmeter
t	Tonne
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
W	Watt
c	centi (10 ⁻²)
m	milli (10 ⁻³)
μ	mikro (10 ⁻⁶)
n	nano (10 ⁻⁹)
p	pico (10 ⁻¹²)

PRÄSENTATIONEN

Deutsche Entomologen Tagung 2001 in Düsseldorf

Ermittlung von DNA-Polymorphismen bei mehreren deutschen Herkünften des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis*) mittels RAPD-PCR

HOMMEL, B.; LIEBE, D.; BURGERMEISTER, W.

ESF-Tagung 2001 in Ceske Budejowice

Monitoring of exological effects of insect-resistant maize expressing *Bacillus thuringiensis* toxins. Part 1: Effects on European corn borer (ECB), *Ostrinia nubilalis* (Hbn.)

LIEBE, D.; MEISE, T.; Langenbruch, G.-A.; HOMMEL, B.; BURGERMEISTER, W.

Deutsche Pflanzenschutz-Tagung 2002 in Bonn

Populationsgenetische Untersuchungen des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis*) aus ausgewählten deutschen Befallsgebieten – Beitrag zum Insektenresistenzmonitoring von *Bt*-Mais

LIEBE, D.; HOMMEL, B., Burgermeister, W.; LANGENBRUCH, G.-A.; MEISE, T.

Deutsche Entomologen-Tagung 2003 in Halle

Populationsgenetik bei ausgewählten deutschen Herkünften des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis*) als Grundlage für das Resistenzmanagement von *Bt*-Mais

LIEBE, D.; HOMMEL, B., Burgermeister, W.; LANGENBRUCH, G.-A.; MEISE, T.

1 EINLEITUNG

1.1 Biologie, Schadwirkung und Bekämpfung des Maiszünslers *Ostrinia nubilalis*

1.1.1 Biologie von *O. nubilalis*

Der Maiszünsler *Ostrinia nubilalis*, der von 1917 bis 1960 unter dem Namen *Pyrausta nubilalis* Hübner geführt wurde (BRINDLEY & DICKE, 1962), gehört zu den Kleinschmetterlingen aus der Familie der Pyralidae (Abb. 1) und findet sich, mit Ausnahme von Australien, auf allen Kontinenten (GÜNTHER et al., 1994).

Zum Wirtspflanzenspektrum gehören über 200 Pflanzenarten, darunter viele Wildgräser und -kräuter, Gemeiner Hopfen *Humulus lupulus*, Hanf *Cannabis sativa*, Gemeiner Beifuß *Artemisia vulgaris* und hauptsächlich die Kulturpflanze Mais *Zea mays* (LOSEY et al., 2001). In Deutschland kommt *O. nubilalis* in den zwei optisch nicht unterscheidbaren Rassen Z und E vor, die sich in einem reziproken Mischungsverhältnis der beiden Isomere eines Sexualpheromons der weiblichen Individuen unterscheiden. Die E-Rasse kommt hauptsächlich am Beifuß *A. vulgaris* und wildem Hopfen *H. lupulus* und die Z-Rasse überwiegend am Mais vor.

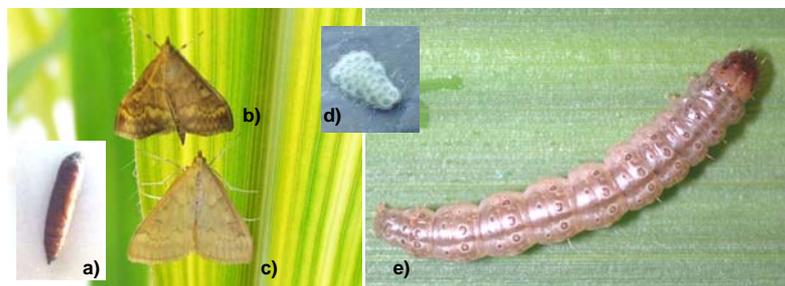


Abb. 1: Entwicklungsstadien des Maiszünslers *O. nubilalis* Hübner: a) Puppe, b) männlicher Falter, c) weiblicher Falter, d) Eigelege, e) Larve im 5. Entwicklungsstadium (nicht maßstabgerecht)

Die im Herbst die Maisernte überlebenden etwa 3 cm großen Larven des fünften Entwicklungsstadiums (L5) überwintern in den Maisstoppeln (Abb. 1e). Hierbei können sie Temperaturen bis -25 °C überleben, die z. B. in Brandenburg auftreten können. Die Puppenruhe dauert eine bis drei Wochen und findet von Mai bis Juni des darauffolgenden Jahres statt (Abb. 1a). Die nur nachts fliegenden braunen Falter (Abb. 1) beginnen schon 24 Stunden nach dem Schlupf mit der Eiablage, die sich auf etwa sieben Tage erstreckt (BURGSTALLER, 1974). Es werden 5 bis 50 Eier pro Gelege dachziegelartig an der Unterseite der Maisblätter platziert (Abb. 1d) (ANDALORO et al., 1982). Daraus schlüpfen nach eigenen Beobachtungen in Abhängigkeit von der Temperatur nach ca. 4 bis 9 Tagen

die 1 – 2 mm großen Eilarven (L1). Diese fressen sich oft in kurzer Zeit zum männlichen Blütenstand, der sog. Fahne, durch, was zum charakteristischen Abknicken der Fahne führt (Abb. 2). Durch den späteren Fraß an den Blättern und den Kolben und vor allem im Maisstängel erfolgt eine Behinderung der Wasser- und Nährstoffversorgung sowie des Assimilattransportes. Weiterhin wird durch den Minierfraß (Abb. 2) die mechanische Stabilität des Stängels zunehmend geschwächt, dies führt bei starkem Wind zum Abknicken der Pflanzen.



Abb. 2: Sichtbare Schädigungen von Maispflanzen durch den Maiszünsler *O. nubilalis*: Abbrechen der Fahne als erstes Anzeichen des Befalls (linkes Bild), später folgt eine Rotfärbung der Blätter und das Umbrechen der Stängel durch Minierfraß der Larven im Stängel (Oderbruch, 2002)

Das Ursprungsgebiet von *O. nubilalis* liegt nach ZWÖLFER (1928b) wahrscheinlich in den asiatischen Steppengebieten. Aus Europa kommend wurde *O. nubilalis* zwischen den Jahren 1909 und 1914 wahrscheinlich von Ungarn oder Italien nach Nordamerika eingeschleppt (SMITH, 1920). Dort breitete sich der *European corn borer* schnell über viele Bundesstaaten aus und entwickelte bi- und multivoltine Generationen. Auch in Europa kann *O. nubilalis* in Südspanien, Griechenland und Süditalien drei Generationen/Jahr (multivoltin), in Norditalien, Nordspanien und Südfrankreich zwei Generationen/Jahr (bivoltin) erreichen. In Deutschland hingegen entwickelt *O. nubilalis* nur eine Generation/Jahr (univoltin).

Die Ausbreitung von *O. nubilalis* über ganz Europa begann sicherlich vor Beginn des 20. Jh. und wurde durch sein umfangreiches Wirtspflanzenspektrum begünstigt. Bereits 1926 erstellte WILKE (1926) eine detaillierte Auflistung des Vorkommens von *O. nubilalis* in Europa. In dieser Aufzählung wurde deutlich, dass auch bereits in Deutschland eine weite Ausbreitung von *O. nubilalis* stattgefunden hatte (von südlichen Gebieten Baden-Württembergs bis in den nördlichen Teil des heutigen Mecklenburg-Vorpommerns).

Dieses Vordringen von *O. nubilalis* erfolgte „unauffällig“ an Mais, Hanf und an anderen Wirtspflanzen (HUGGER, 1998). Erst mit dem intensiven Maisanbau erfolgte eine explosionsartige Vermehrung. Da zu dieser Zeit noch keine Unterscheidung der E- und Z-Rasse vorgenommen wurde, kann nur vermutet werden, dass es sich bei den an Mais befindlichen Zünlern von *O. nubilalis* um die Z-Rasse handelte. Als Erster vermutete ANDERSEN (1943) Anfang der 40er Jahre, dass es sich bei seinen Untersuchungen zu *O. nubilalis* an Hopfen um zwei Rassen handelt. Zwölfer (1928b) nimmt an, dass der Zünsler seine Nährpflanzenpräferenz im Laufe der Zeit geändert hat, indem er ein an Mais angepasstes (*co-evolutive*) Verhalten zeigte. Die Entstehung großer Befallsgebiete der Z-Rasse in Deutschland geht sicherlich auf einen nach 1950 verstärkten Körnermaisbau mit Hybridsorten und die Ausweitung des Silomaisbaus als Folge der Konzentration der Tierhaltung zurück. Hohe, schädigende Populationsdichten von *O. nubilalis* stellen somit in erster Linie das Ergebnis der Vermehrung vorhandener Populationen dar. Diese hohen Abundanzen trugen und tragen wiederum zur weiteren Ausbreitung der Z-Rasse von *O. nubilalis* in nördlichere Maisanbauggebiete bei, wie z. B. nach Mecklenburg-Vorpommern und Niedersachsen.

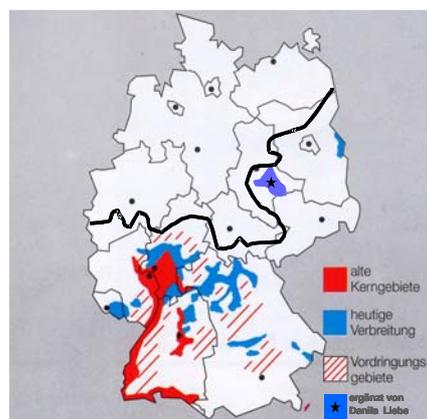


Abb. 3: Verbreitung des Maiszünslers *O. nubilalis* in Deutschland (Quelle: ANONYMUS, 1998a); die schwarze Linie zeigt die heutige Verbreitungsgrenze (pers. Mitt. LANGENBRUCH, 2003)

Es gibt mindestens vier große, seit vielen Jahren etablierte Befallsgebiete in Deutschland (Abb. 3): Das erste und älteste deutsche Befallsgebiet erstreckt sich den Rhein entlang von Karlsruhe über Freiburg bis an den Bodensee. Durch eine Einwanderung aus Österreich ins untere Inntal kam es zu einem zweiten Befallsgebiet im südostdeutschen Raum, z. B. um Pocking (LANGENBRUCH et al., 2000). Das dritte Befallsgebiet befindet sich im westdeutschen Raum von Würzburg bis zum Hessischen Ried und Bonn als nördliche Grenze. Ein viertes ausgedehntes Befallsgebiet liegt in Nordostdeutschland im Oderbruch

(LANGENBRUCH & KLEESPIES, 1998). Die erst seit wenigen Jahren beobachteten Schäden im Maisanbau in Thüringen, Sachsen und Sachsen-Anhalt sowie im südlichen Brandenburg bilden ein neues Befallsgebiet, das vor allem eine Folge des seit Mitte der 90er Jahre intensivierten pfluglosen Anbaus der dem Mais folgenden Kulturen, insbesondere von Weizen, in diesen Bundesländern ist.

1.1.2 Schadwirkung von *O. nubilalis*

Mais (*Zea mays*) gehört weltweit zu den wichtigsten Nahrungs- und Futtermittelpflanzen. Jährlich werden ca. 600 Mio. t Körnermais erzeugt, davon etwa 40 % in den USA. In Deutschland wurden im Jahr 2001 überwiegend Silomais und Corn-Cob-Mais (CCM) auf insgesamt 1,133 Mio. ha sowie Körnermais auf 0,397 Mio. ha angebaut (ANONYMUS, 2002a); die überwiegende Nutzung erfolgt als Futtermittel für Rinder, Schweine und Geflügel. Demzufolge hat der Mais eine große ökonomische Bedeutung. Dem stehen Ertragsverluste von weltweit durchschnittlich 38 % gegenüber (OERKE & STEINER, 1996), die durch Krankheiten (11 %), Unkräuter (13 %) und tierische Schaderreger (14 %) verursacht werden. OERKE & STEINER (1996) stellten fest, dass ihre Schätzungen von Produktionsverlusten bei Mais mit denen von CRAMER (1967) weitgehend übereinstimmen. Das heißt, in einem Zeitraum von 30 Jahren hat sich die Ertragswirksamkeit des Pflanzenschutzes kaum verbessert. Zu den weltweit bedeutendsten Schaderregern im Maisanbau gehört *O. nubilalis*. Weitere wichtige Schädlinge sind die Fritfliege *Oscinella frit*, Drahtwürmer (Larven von *Agriotes*-Arten) und der Westliche Maiswurzelbohrer *Diabrotica virgifera virgifera*.

Unter den von OERKE & STEINER (1996) geschätzten jährlichen Ertragsverlusten durch tierische Schaderreger von weltweit 14 % vernichtet allein *O. nubilalis* ca. 7 % der Ernten (THOMAS et al. 2000), das entspricht ungefähr 68 Mio. t. HUGGER (1998) gibt an, dass eine Larve pro Pflanze einen Ertragsverlust von 4 % verursacht. Schätzungen von ZELLNER (1994) geben bei einer Befallsstärke von zwei bis drei Raupen pro Pflanze Ertragsverluste im langjährigen Mittel von 10 % bis 30 % an. Durch den Fraß im Maisstängel und später am und im Kolben entstehen Eintrittspforten für Sekundärinfektionen mit verschiedenen Pilzarten. Diese können giftige Stoffwechselprodukte, sogenannte Mykotoxine, bilden, die für Tier und Mensch gleichermaßen ein gesundheitliches Risiko darstellen. Zu den wichtigsten Mykotoxinen bei Mais gehören Aflatoxine und Ochratoxin A, die hauptsächlich nach der Ernte, sowie Deoxynivalenol, Zearalenon und Fumonisine, die bereits auf dem Feld entstehen. Diese Stoffwechselprodukte werden von verschiedenen

Pilz-Arten gebildet: Aflatoxine durch *Aspergillus*-Arten, Ochratoxin A durch *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten, Fumonisine, Deoxynivalenol, Zearalenon durch *Fusarium*-Arten (DÄNICKE & VALENTA, 1999; ANONYMUS, 2003a). Indirekte und direkte Pflanzenschutzmaßnahmen gehören somit zu den wichtigsten Voraussetzungen für die ökonomische Produktion von *gesundem* Mais und tragen damit wesentlich zum Verbraucherschutz und zur Tiergesundheit bei.

1.1.3 Bekämpfung von *O. nubilalis*

Die effektivste indirekte Maßnahme zur Abwehr von Schäden durch *O. nubilalis* ist das Pflügen der Maisstoppel unmittelbar nach der Ernte. Diese Maßnahme konkurriert jedoch heute oft mit bodenkonservierenden Anbauverfahren zur Erhaltung und Mehrung der Bodenfruchtbarkeit. Damit treten direkte Verfahren wie der chemische und biologische Pflanzenschutz zur Abwehr von *O. nubilalis* in den Mittelpunkt. Eine weitere wichtige Bekämpfungsstrategie, nämlich der Anbau insektenresistenter Sorten, konnte bisher von den Landwirten nicht berücksichtigt werden, weil die konventionelle Züchtung solche Sorten nicht zur Verfügung stellen konnte. Erst mit der gentechnischen Übertragung der *cry*-Gene (*cry* steht für *crystal*) des insektenpathogenen *Bacillus thuringiensis* in Maissorten (sog. *Bt*-Mais) gelang der Durchbruch. Für integrierte Pflanzenschutzstrategien zur Bekämpfung von *O. nubilalis* stehen damit mehrere indirekte und direkte Bekämpfungsmaßnahmen zur Verfügung.

Der Wirtspflanzenresistenz und dem biologischen Pflanzenschutz kommen bei der Minimierung der Anwendung chemischer Pflanzenschutzmittel (PSM) im Rahmen des integrierten Pflanzenschutzes zentrale Rollen zu (BURTH et al., 2002; FREIER et al., 1999). Nach FREIER et al. (1999), die eine vorwiegend auswirkungsorientierte und weniger handlungsorientierte Bewertung eines Pflanzenschutzsystems fordern, müssen auch insektenresistente Sorten einer kritischen Betrachtung hinsichtlich kurz- und langfristiger Risiken unterzogen werden. Hierbei ist es unerheblich, ob diese Sorten konventionell gezüchtet oder gentechnisch verändert wurden. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht deshalb die Bewertung der Selektion resistenter *O. nubilalis*-Populationen als Folge des Anbaus von *Bt*-Mais und die sich daraus ergebende Notwendigkeit zur Entwicklung eines Insektenresistenzmanagements (IRM) und der dazugehörigen Monitoringmethoden.

Aufgrund der schädlichen Auswirkungen von *O. nubilalis* auf die Maisqualität als Nahrungs- und Futtermittel ist seine gezielte Bekämpfung von großer wirtschaftlicher

Bedeutung. Hierfür stehen folgende vorbeugende und direkte Bekämpfungsmöglichkeiten zur Verfügung:

1. Mechanische Bekämpfung: Die wichtigste vorbeugende Maßnahme zur Verhinderung hoher Populationsdichten im Folgejahr ist das Schlegeln der Stoppel und ein ca. 30 cm tiefes Unterpflügen der Maisreste, welches die Anzahl der überwinterten Larven um bis zu 99 % verringern kann (SCHRÖDER, 2000). Nach eigenen Beobachtungen im Oderbruch, wo das Pflügen aus bodenphysikalischen Gründen nach der Maisernte im Herbst oft sehr schwierig oder unmöglich ist, wurden auf vielen Feldern nicht einmal die Stoppel geschlegelt. Offenbar wird die Bedeutung dieser mechanischen Bekämpfungsmaßnahme für den nächstjährigen Maisanbau immer noch unterschätzt.
2. Chemische Bekämpfung: Bei den synthetischen Pflanzenschutzmitteln standen und stehen Pyrethroide, Phosphorsäureester und Methylcarbamate zur Verfügung. Für das Jahr 2002 war in Deutschland nur das Pyrethroid Baythroid 50 (Cyfluthrin) zugelassen (ANONYMUS, 2002b). Bei optimalem Applikationszeitpunkt sind Wirkungsgrade von 70 % – 90 % erreichbar. Der Behandlungsindex für Insektizide in Mais, der von ROßBERG (pers. Mitt., 2003) auf Grundlage der Umfrage NEPTUN berechnet wurde, beträgt 0,03, d. h. nur 3 ha von 100 ha werden mit Insektiziden und der zugelassenen Aufwandmenge behandelt. Die Bestimmung des optimalen Ausbringungszeitpunktes für alle Insektizide erfolgt mittels Licht- oder Pheromonfallen. Die Bekämpfungsmaßnahme wird jedoch oft zu einem früheren Termin, bei dem *O. nubilalis* den Höhepunkt der Eiablage noch nicht erreicht hat, durchgeführt, damit die übliche Applikationstechnik den dann 1 m – 1,5 m hohen Mais nicht schädigt. Alternativ wäre der Einsatz von Stelzenfahrzeugen denkbar, die allerdings nur selten zur Verfügung stehen. Ein negativer Aspekt der chemischen Bekämpfung ist die Belastung der Umwelt. Da die Insektizide nicht selektiv wirken, können Nützlinge dezimiert oder zumindest zeitweilig die Diversität der Arthropodengesellschaften vermindert werden.
3. Biologische Bekämpfung: Biologische Gegenspieler von *O. nubilalis* sind Parasitoide und Krankheitserreger. Zu den Parasitoiden gehören Wespen der Arten *Macrocentrus grandii*, *Eriborus terebrans*, *Trichogramma* spp. und die Fliege *Lydella thompsoni*. Zu den Krankheitserregern zählen die parasitischen Einzeller (Protozoen, Mikrosporidien) wie *Nosema pyrausta*, *Vairimorpha necatrix*, der Pilz

Beauveria bassiana, das Bakterium *Bacillus thuringiensis* sowie Viren, die zuvor aus *Autographa californica* und *Rachiplusia ou* isoliert wurden (SHOWERS et al., 1996). Von allen bekannten Gegenspielern von *O. nubilalis* haben sich innerhalb der Parasitoide nur die Eiparasiten der Gattung *Trichogramma* und bei den Krankheitserregern das Bakterium *B. thuringiensis* in der Praxis durchgesetzt. Die winzige Schlupfwespe *Trichogramma* spp. legt ihre Eier in die Gelege von *O. nubilalis*, deren Inhalt von den Larven der Schlupfwespe aufgebraucht wird (ANONYMUS, 1988; KRIEG & FRANZ, 1989). In Deutschland wurden im Jahr 2002 auf ca. 11 000 ha *Trichogrammen* eingesetzt. Diese wurden bisher meist als Kärtchen mit aufgeklebten Parasitenpuppen, sog. *Trichogramma*-Kärtchen, ausgebracht. Für die Anwendung auf großen Flächen ist jedoch ein hoher personeller Aufwand erforderlich. Seit 2001 werden daher *TrichoKugeln* mit Stelzenschleppern oder Agrarflugzeugen ausgebracht. Die erzielten Wirkungsgrade lagen dabei in Versuchen deutlich über 80 % (<http://www.amw-nuetzlinge.de>). Der Einsatz von *Trichogramma* spp. ist teurer und stark witterungsabhängig, aber die Wirkung kann häufig besser als eine Insektizidbehandlung sein.

Biologische PSM sind aus den Sporen und Kristallen des *B. thuringiensis* entwickelt worden. In Deutschland sind die beiden Präparate Dipel 2 X und Dipel ES zugelassen (ANONYMUS, 2002b), die fünf verschiedene Kristalltoxine Cry1A(a), Cry1A(b), Cry1A(c), Cry2A, Cry2B enthalten (TABASHNIK et al., 1997). Wegen ihrer geringen Wirksamkeit müssen die Präparate mehrfach bei engen zeitlichen Spritzterminen angewandt werden und verursachen damit hohe Kosten. Daher konnten sie sich in der Praxis nicht durchsetzen und die ökologischen Vorteile von *B. thuringiensis* im integrierten Pflanzenschutz bei Mais nicht genutzt werden. Die gentechnische Nutzung der Kristalltoxine von *B. thuringiensis* für die Züchtung resistenter Sorten war deshalb ein erwarteter Schritt.

4. Resistente/Tolerante Sorten: Bisher ist es nicht gelungen, über klassische Züchtung Sorten mit hoher Resistenz gegen *O. nubilalis* zu entwickeln. Im Mittelpunkt der klassischen Züchtung steht die allelochemische Verbindung DIMBOA (2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one) (SMITH, 1989). Sie wird von bestimmten Sorten nach mechanischer Verletzung der Blätter gebildet und übt eine repellente Wirkung auf *O. nubilalis*-Larven aus. Die Züchtung toleranter Sorten, den sog. OS-Hybriden, wird aus Kroatien (Osijek) berichtet (RASPUDIC et al., 2002). Für den Maisanbau in deutschen Befallsgebieten von *O. nubilalis* spielen

jedoch diese Sorten keine Rolle. In der aktuellen *Beschreibenden Sortenliste des Bundessortenamtes* sind für Mais keine Hinweise auf Resistenz oder Toleranz bei den Sorten gegenüber *O. nubilalis* aufgeführt (ANONYMUS, 2002c). Gegenüber diesen klassischen Ansätzen zur Resistenz- und Toleranzzüchtung hat sich die gentechnische Entwicklung von resistenten Sorten auf der Grundlage von *B. thuringiensis*-Genen rasant entwickelt. Der Anbau von gentechnisch veränderten Maissorten (sog. *Bt*-Mais), in denen innerhalb der Pflanze das bekannte *Bt*-Toxin gebildet wird, welches die Zünslerlarve abtötet, stellt somit eine bedeutende Alternative zu den bisherigen Bekämpfungsmaßnahmen dar. Bis 2003 war jedoch der kommerzielle Anbau von *Bt*-Mais in Deutschland nicht zugelassen. Nur ein begrenzter Anbau für die biologische Begleitforschung fand in Deutschland seit 2001 statt.

1.2 Maiszünslerresistenter *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)-Mais

Mittels der Gentechnik wurden sog. *Bt*-Toxingene, welche aus dem gram-positiven Bodenbakterium *Bacillus thuringiensis* Berliner (Bacillaceae) stammen, ins Genom der Maispflanze eingebaut. Neben einem *Bt*-Gen enthalten die meisten *Bt*-Maissorten noch Selektionsmarker wie die *Phosphinothricin-Acetyl-Transferase* (*PAT*) (*bar*-Gen) und die *5-Enolpyruvylshikimate-3-Phosphate Synthase* (*EPSPS*), die der Pflanze Resistenz gegen das Unkrautbekämpfungsmittel Glufosinat bzw. Glyphosat verleihen. Weitere Selektionsmarker sind die Antibiotikaresistenzen für Kanamycin und Neomycin (*nptII*-Gen) sowie für Ampizillin (*bla*-Gen) (CARPENTER et al., 2002). Das *bla*-Gen, das z. B. im Konstrukt *Bt176* enthalten ist, führt zur Selektion der transformierten Bakterien, die den gewünschten Genaufbau im Plasmid beherbergen. Da der Promotor des *bla*-Gens im Mais nicht erkannt wird, findet dort auch keine Expression statt. Bei dem Konstrukt *Mon810* befindet sich kein Antibiotikaresistenzgen in der *Bt*-Pflanze, da die entsprechende Gensequenz *nptII* nur zur Selektion der Bakterien während der Herstellung des Plasmidvektors benutzt wurde. In naher Zukunft werden keine *Bt*-Pflanzen mit Antibiotikaresistenzgenen mehr zugelassen, um das Risiko einer Resistenzentwicklung bei Human- und Tierpathogenen über einen horizontalen Gentransfer auszuschließen.

Durch die Einführung synthetischer, an die pflanzliche *codon-usage* angepasster *Bt*-Gene werden die Nukleotidunterschiede (z. B. unterschiedlicher G/C-Gehalt) zwischen Pflanze und Bakterium minimiert, was zu einem erhöhten Expressionsniveau des Toxins in den Pflanzen führt. PERLAK et al. (1991) konnten dadurch einen 100fach höheren Toxingehalt

(Cry1Ab) bei transformierten Tomaten erhalten. Das Toxin liegt in den Pflanzen verkürzt, aber noch nicht aktiviert, vor. Das Toxin besitzt bei *Bt176* eine molekulare Masse von 72,6 kDa, bei Mon810 von 92 kDa; das aktive Toxin ist 66,7 kDa groß (pers. Mitt. JEHLE, 2003).

Das Protoxin des Bakteriums wird von den Larven aufgenommen und im basischen Milieu des Mitteldarmes (pH 9 bis 11) durch proteolytische Spaltung ins aktive Toxin überführt. Das Toxin bindet nach der Durchdringung der peritropfen Membran an spezifische Rezeptoren, die sich an der Membran der Mitteldarmepithelzellen befinden (VAN RIE, 2000; HONEE & VISSER, 1993). Dies führt zur Induktion von Poren im Mitteldarmepithel und zu vakuolisierten Mitteldarmepithelzellen (Abb. 4), die durch den eintretenden Wasserstrom lysieren (KNOWLES, 1994). Durch die eintretende Darmperforierung wird der Elektrolyt- und pH-Gradient zerstört und die Aufnahme von Aminosäuren verhindert. Eine große Anzahl an Larven sterben daher infolge von Toxämie innerhalb von fünf Tagen. Erstes Anzeichen ist oft ein einsetzender Fraßstopp bereits nach 24 Stunden, gefolgt von

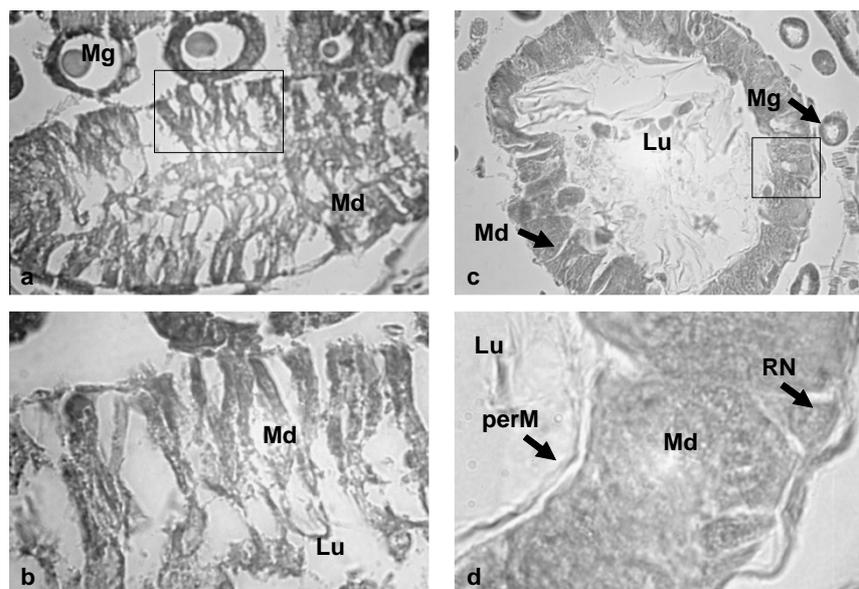


Abb. 4: Geschädigtes Mitteldarmepithel einer *O. nubilalis*-Larve 30 Stunden nach Aufnahme des *Bt*-Toxins (a & b) im Vergleich zu einer gesunden Larve (c & d); (Lu = Darmlumen, Md = Mitteldarmepithelzellen, Mg = Malpighische Gefäße, perM = peritrophe Membran, RN = Regenerationsnest; (Histologie: D. LIEBE, Foto: K. BRIESEMANN, Kamera: Axioplan 2 von Zeiss, Vergrößerung: a, c) 200 x; b, d) 1000 x)

einer Paralyse und Diarrhö (Abb. 5). Bei geringen Toxindosen ist die Schädigung des Mitteldarmes reparabel, bei hohen Dosen folgt dem Fraßstopp der Tod der Larven.



Abb. 5: Durch Cry1Ab erkrankte Larve von *O. nubilalis* (Schlaffsucht): die Larve verklebt aufgrund der Diarrhö am Blatt und verliert infolge der Lähmung ihren Halt

Mit der Zerstörung der Darmwand können weiterhin Mikroben aus dem Darm in die Leibeshöhe des Insekts eintreten, sich vermehren und somit die Zahl der sterbenden Larven erhöhen (Septikämie).

Die spezifische Wirkung des *Bt*-Toxins auf Schmetterlingslarven ist im Sinne des integrierten Pflanzenschutzes (NEEMANN & BRAUN, 1997), da nur sehr wenige Nichtzielorganismen miterfasst werden. Für den Menschen und andere Warmblüter stellt das *Bt*-Toxin kein Risiko dar, da an der Oberfläche der Zellen des Verdauungstraktes sich keine Rezeptoren für das Cry1Ab Protein befinden. Weiterhin besitzt das Protein kein signifikantes Allergierisiko, weil es keine Charakteristiken bekannter Allergene aufweist (Anonymus, 2001a).

Die *Bt*-Toxine werden in zwei Gruppen unterteilt: Cry (crystal)- und Cyt (cytolytic)-Toxine. KRIEG (1986) stellte den *Bacillus thuringiensis* entsprechend seiner Pathogenität in drei Pathotypen A – C (A Lepidopteren, B Nematoceren: Dipteren und C Coleopteren: Chrysomeliden) zusammen. Er erkannte, dass eine Korrelation zwischen Pathogenität (Virulenz) und taxonomisch relevanten Eigenschaften, wie z. B. der Kristalltyp oder Serotyp, nicht sicher ist. HÖFTE & WHITELEY (1989) führten eine Klassifizierung der δ -Endotoxine anhand der Nucleotidsequenz ihrer Gene und ihrem Wirkungsspektrum ein. Die Toxingene werden in vier Hauptgruppen (CryI - IV) eingeteilt, die das gleiche Wirkspektrum und die gleichen Strukturmerkmale besitzen. Es werden folgende Klassen unterteilt: CryI - wirksam gegen Lepidopteren, CryII - wirksam gegen Lepidopteren- und Dipteren, CryIII - wirksam gegen Coleopteren, CryIV - wirksam gegen Dipteren. Da mit noch weiteren Toxingenen gerechnet wird, ist diese Klasseneinteilung nur vorläufig. 1993 wurde das *Bacillus thuringiensis* delta-Endotoxin Nomenklatur Komitee gegründet, um die Systematik, die ursprünglich von HÖFTE & WHITELEY (1989) erstellt wurde, zu

überarbeiten. Nach dieser neuen Nomenklatur werden keine Klammern und römischen Zahlen mehr verwendet. Von den über 100 verschiedenen Cry-Genen, die bisher kloniert und charakterisiert wurden (CRICKMORE, 2002), sind nur wenige gegen bestimmte Schädlinge wirksam.

Seit den 90er Jahren wurden einige *Bt*-Maissorten von verschiedenen Firmen mit unterschiedlichen Konstrukten entwickelt. Die folgende Tabelle zeigt eine Zusammenstellung der auf dem außereuropäischen Markt befindlichen *Bt*-Maissorten (ANONYMUS, 2002d).

Tab. 1: Zusammenstellung der für die Züchtung zur Verfügung stehenden *Bt*-Maiskonstrukte mit Resistenz gegen den Maiszünsler *O. nubilalis*

Konstrukt	Hersteller	Art des Kristall-Toxins und <i>Bt</i>-Unterart	Kopplung mit weiteren Genen als Trait oder Marker
<i>Bt</i> 176	Syngenta Seeds, Inc.	Cry1Ab <i>B.t. subsp. kurstaki</i>	Phosphinothricin-N-Acetyl-Transferase (PAT) von <i>Streptomyces hygroscopicus</i>
<i>Bt</i> 11	Syngenta Seeds Inc.	Cry1Ab <i>B.t. subsp. kurstaki</i>	Phosphinothricin-N-Acetyl-Transferase (PAT) von <i>Streptomyces viridochromogenes</i>
CBH-351	Aventis CropScience	Cry9C <i>B.t. subsp. tolworthi</i>	Phosphinothricin-N-Acetyl-Transferase (PAT) von <i>Streptomyces hygroscopicus</i>
DBT418	Dekalb Genetics Corporation	Cry1Ac <i>B.t. subsp. kurstaki</i>	Phosphinothricin-N-Acetyl-Transferase (PAT) von <i>Streptomyces hygroscopicus</i>
Mon80100	Monsanto Company	Cry1Ab <i>B.t. subsp. kurstaki</i>	Keine
Mon802	Monsanto Company	Cry1Ab <i>B.t. subsp. kurstaki</i>	5-Enolpyruvyl-shikimat-3-Phosphat Synthase (EPSPS)
Mon809	Pioneer Hi-Bred International Inc.	Cry1Ab <i>B.t. subsp. kurstaki</i>	5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphat Synthase (EPSPS)
Mon810	Monsanto Company	Cry1Ab <i>B.t. subsp. kurstaki</i> HD-1	-
TC1507	Mycogen; Pioneer	Cry1F <i>B.t. var. aizawai</i>	Phosphinothricin-N-Acetyl-Transferase (PAT) von <i>Streptomyces viridochromogenes</i>

Innerhalb der EU sind nur die Maiskonstrukte *Bt176*, *Mon810* und *Bt11* in Verkehr gebracht worden (SAEGLITZ & BARTSCH, 2003). Ein kommerzieller Anbau findet zur Zeit allerdings nur in Spanien statt.

Mais mit den Toxin-Typen *Cry1Ab*, *Cry1Ac*, *Cry1F* und *Cry9C* hat eine Resistenz gegen *O. nubilalis* (ANDOW & HUTCHISON, 1998). Die Toxinmenge und der Ort der Produktion sind bei den verschiedenen *Bt*-Konstrukten unterschiedlich. So wird bei *Bt11*, *CBH351* und *Mon810* das Toxin in allen Pflanzenteilen, hingegen bei *Bt176* und *DBT418* nicht in der Wurzel, im Mark, in den Körnern und in der Seide produziert (pers. Mitt. Herr Dr. MÜLLER (MONSANTO), 2000; HUGGER, 1998). Unter den aufgeführten *Bt*-Konstrukten werden am häufigsten *Bt176* und *Mon810* unter den Namen *NaturGard™* (Firma Syngenta) bzw. *YieldGard®* (Firma Monsanto) in der Praxis eingesetzt.

Gentechnisch veränderter *Bt*-Mais wurde in den USA im Jahr 2002 auf ca. 10 Mio. ha (34 % der Gesamtanbaufläche von Mais) angebaut. Darunter befinden sich viele Konstrukte, die in der EU nicht zugelassen sind. In Spanien, das als einziges EU-Land seit 1998 *Bt*-Mais anbaut, beträgt der Anteil für insektenresistenten *Bt*-Mais ca. 4 % bis 5 %. Insgesamt wurden im Jahr 2002 ca. 25 000 ha *Bt*-Mais in Spanien angebaut. Dem gegenüber betrug die Anbaufläche in Deutschland nicht mehr als 500 ha *Bt*-Mais, der nicht für den kommerziellen Verbrauch eingesetzt werden darf (<http://www.transgen.de>). Allein im Oderbruch wurden im letzten Jahr auf großen zusammenhängenden Feldflächen insgesamt ca. 200 ha *Bt*-Mais im Rahmen der Sortenzulassungsprüfung und für wissenschaftliche Fragestellungen angebaut.

Da beim Anbau von *Bt*-Mais nicht ausgeschlossen werden kann, dass auch Nichtzielorganismen geschädigt werden können, wurden innerhalb des vom BMBF geförderten Verbundprojektes mögliche Einflüsse des *Bt*-haltigen Pflanzenmaterials (Bestandsabfall) einschließlich der Wurzeln auf mikrobielle Bodenaktivität sowie auf bodenbewohnende saprophage Organismen (Collembolen) untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Collembolen beim Abbau der Pflanzenrückstände nicht geschädigt werden (pers. Mitt. MÜCHER, 2003). In anderen Arbeiten wurden ebenfalls keine negativen Auswirkungen bei den räuberischen Wanzen *Orius majusculus* (ZWAHLEN et al., 2000) und *Orius insidiosus* (PILCHER et al., 1997) und Bienen festgestellt. Eine erhöhte Larvalmortalität bei den Florfliegen *Chrysoperla carnea* konnte jedoch durch das Verfüttern von subletal durch *Bt*-Mais geschädigten *O. nubilalis*-Raupen ermittelt werden (HILBECK et al., 1998). Weiterhin ist bei anderen Schmetterlingsarten, wie z. B. beim

amerikanischen Monarchfalter *Danaus plexippus* (LOSEY et al., 1999) und bei europäischen Schmetterlingsarten, wie dem großen und kleinen Kohlweißling *Pieris brassicae*, *Pieris rapae*, der Kohlmotte *Plutella xylostella*, dem Pfauenauge *Inachis io* die toxische Wirkung von *Bt*-Mais Pollen nachgewiesen worden (FELKE & LANGENBRUCH, 2001, 2002). Jedoch wurden bei den Erdeulen *Agrotis segetum* keine negativen Auswirkungen festgestellt. Die negativen Effekte bei den Lepidopteren treten hauptsächlich durch die Aufnahme des Pollens auf. Bei dem Konstrukt *Bt176* liegt die *Bt*-Konzentrationen 1,1 µg/g – 7,1 µg/g Pollen und bei den Konstrukten *Bt11* und *Mon810* beträgt der Wert von 0,09 µg/g Pollen (SEARS et al., 2001). Durch eine gezielte *Bt*-Expression in bestimmten Pflanzenorganen, die den Pollen ausschließt, könnten diese potentiellen negativen Auswirkungen auf Nichtzielorganismen eliminiert werden. Die meisten Laborergebnisse haben jedoch kaum ökologische Relevanz, weil sie nicht auf das Freiland übertragbar sind. So findet eine Koinzidenz zwischen dem Pollenflug und dem Raupenfraß von Nichtziel-Organismen äußerst selten und in bedeutend geringeren Mengen als im Labor statt. Weiterhin führen klimatische Bedingungen wie Regen und Wind zu einer kurzen Ablagerung des Pollens auf der Maispflanze und den Nichtziel-Organismen stehen darüber hinaus eine Reihe von Alternativpflanzen anstelle des Mais zur Verfügung.

1.3 Insektenresistenzmanagement (IRM) von *Bt*-Mais

Der Anbau von *Bt*-Mais kann zur Selektion resistenter Tiere von *O. nubilalis* führen. Ein nachhaltiger Anbau von *Bt*-Mais erfordert daher ein Insektenresistenzmanagement (IRM) mit dem Ziel, die Entwicklung resistenter Populationen zu verhindern oder zumindest zu verzögern.

Die Anpassung von *O. nubilalis* an *Bt*-Mais ist gekennzeichnet durch ein Überleben der unempfindlichen, d. h. resistenten Individuen, und eine Weitergabe der genetisch fixierten Resistenzeigenschaften an die Nachkommen (STEINBRINK et al., 1989). Durch Mutationen können sich Resistenzgene entwickeln, die einen Selektionsvorteil gegenüber den empfindlichen Individuen vermitteln. Diese Resistenzentwicklung ist definiert durch die Anzahl von Jahren, die erforderlich ist, um die Resistenzallelfrequenz von 0,001 auf 0,03 zu erhöhen (ONSTAD & GUSE, 1999). Bei *O. nubilalis* ist bisher nur im Labor gegen das *Bt*-Präparat Dipel ES, das mehrere Protoxine besitzt (HUANG et al., 1999), und gegen Cry1Ac und z. T. gegen Cry1Ab (BOLIN et al., 1999) eine Resistenz erzeugt worden. Resistente Tiere von *O. nubilalis* erfordern 30- bis 60-mal mehr Toxin gegenüber nicht-resistenten Maiszünlern zur Abtötung von 50 % der Tiere (WITKOWSKI et al., 1997). Im Freiland

wurden bisher keine resistenten Tiere von *O. nubilalis* gefunden. Modellrechnungen für die Bedingungen in den USA ergaben (GOULD et al., 1997), dass bei *Heliothis virescens* (Noctuidae) innerhalb von zehn Jahren eine Resistenzentwicklung im Feld mit 4 % Refugien auftreten könnte. Für ein effizientes Resistenzmanagement ist daher die Erfassung der Ausgangsallelfrequenz von großer Bedeutung. Eine Methode zur theoretischen Bestimmung der Ausgangsallelfrequenzen lieferte ANDOW & ALSTAD (1998) mit einem F2-Screening. Dabei werden Weibchen im Feld gefangen, die Nachkommen getrennt aufgezogen (Halbgeschwisterlinien) und diese F1-Generation untereinander gekreuzt. Das Toxizitätsscreening wird jedoch erst mit den F2-Larven durchgeführt. Mit 95 % Wahrscheinlichkeit ist bei mindestens 100 Halbgeschwisterlinien eine Resistenzallel-Häufigkeit von weniger als 10^{-2} und bei mindestens 1500 Halbgeschwisterlinien eine Resistenzallel-Häufigkeit von weniger als 10^{-4} anzunehmen, wenn keine Resistenz gefunden wird. ANDOW et al. (1998) bestimmten an *Bt*-Pflanzen bei einer amerikanischen *Ostrinia nubilalis*-Population für 81 Halbgeschwisterlinien eine Ausgangsallelfrequenz von kleiner $1,5 \times 10^{-2}$ mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 %, da sie keine überlebenden Larven fanden. Die Resistenz kann durch verschiedene Mechanismen hervorgerufen werden (MÜLLER, 2001a; TABASHNIK, 1994):

- Änderungen an der Darmmembran und deren Rezeptoren und dadurch bedingte verringerte Bindungsaffinität der Toxine an die Darmmembran;
- Veränderung des pH-Wertes im Darm;
- Änderung der Enzymausstattung im Mitteldarm mit den Folgen einer veränderten Spaltung des Protoxins.

Die erste Resistenz gegen *Bt*-Spritzmittel wurde bei der Kohlmotte *Plutella xylostella* im Jahre 1988 im Feld festgestellt (TABASHNIK et al., 1997). Weiterhin wurden im Labor bei verschiedenen Lepidopteren, Coleopteren und Dipteren Resistenzen erfolgreich provoziert (TABASHNIK, 1994).

Um die Resistenzentwicklung im Feld zu verzögern und gleichzeitig den Schaden durch Insektenfraß unter der Toleranzschwelle zu halten, ist ein Resistenzmanagement in den USA entwickelt worden, welches das Ziel verfolgt, Resistenzgene im Genpool einer Population niedrig zu halten und eine ausreichende Anzahl an empfindlichen Larven zu gewährleisten. Für das Resistenzmanagement können mehrere Strategien eingesetzt werden, wobei die Kombination von „*high dose*“ und *Refugien*-Strategie am häufigsten angewandt wird.

- Die „*high dose*“ Strategie besagt, dass *Bt*-Mais mindestens 25fach höher konzentriert sein sollte als benötigt wird, um 99 % der Larven des anfälligsten Stadiums abzutöten (GOULD & TABASHNIK, 1998). ONSTAD & GUSE (1999) definieren in ihrem Modell die hohe Toxindosis, bei der 100 % der homozygot empfindlichen und heterozygot resistenten Individuen des ersten Larvenstadiums sterben. Bei homozygot resistenten Tieren von *O. nubilalis* des empfindlichen ersten Larvenstadiums nehmen sie eine Mortalität von 25 % an. Andere Autoren definieren die „*high dose*“ als Konzentration, bei der 99 % der heterozygoten Individuen abgetötet werden (ANONYMUS, 1999). Voraussetzung für diese Strategie ist eine rezessive Vererbung der Resistenz.
- Wenn die Resistenz autosomal dominant vererbt wird, schlägt diese Strategie fehl, wie Untersuchungen von HUANG et al. (1999) mit Dipel ES zeigten. Dann wäre eine „*refuge/low dose*“ Strategie nach ANDOW & HUTCHISON (1998) empfehlenswert, weil dadurch die scharfe Selektion der resistenten Larven mit hoher Expressionsstärke verhindert und gleichzeitig ein Überleben der Larven gesichert wird, die die Resistenz nur schwach ausprägen (geringe Expressionsstärke). Dies könnte die Entwicklung von *O. nubilalis* durch den geringen Fitnesswert verlangsamen, so dass die anfälligen Schädlinge überleben und gleichzeitig ihr Schaden begrenzt wird (BLATTER & WOLFE, 1996).
- Die Refugien-Strategie beinhaltet, dass neben *Bt*-Mais auch einige Felder mit anfälligem Mais als Refugien angebaut werden. Die wenigen überlebenden (resistenten) Tiere von den Flächen mit *Bt*-Mais stellen dann nur einen sehr geringen Anteil an der gesamten Population eines Befallsgebietes dar, weil eine Kreuzung mit anfälligen Tieren aufgrund des rezessiven Erbgangs wieder Anfällige ergibt und damit die Resistenzentwicklung insgesamt stark verzögert wird. Hierbei stehen die Anbaufläche des anfälligen Mais und die Entfernung zu den *Bt*-Feldern zur Diskussion. Obwohl die überwiegende Anzahl von *O. nubilalis* 800 m und nur wenige über 3,2 km fliegen können (SHOWERS et al., 2001), sollten die Refugien nicht weiter als ca. 300 m vom *Bt*-Mais entfernt sein (STEWART et al., 1999) und eine Refugiengröße von 20 % bis 30 % ohne bzw. 40 % mit Insektizidanwendung besitzen (ANONYMUS, 1998b). Als Vorsorgemaßnahme wird jedoch nach ANDOW & HUTCHISON (1998) eine Refugienfläche von ca. 50 % empfohlen. Die Refugien-Strategie kommt an ihre Grenzen, wo *Bt*-Mais nach *Bt*-Mais nachgebaut wird. Der Verzicht auf diesen

Nachbau von *Bt*-Mais stellt daher eine wichtige Voraussetzung für ein erfolgreiches IRM dar.

- Eine Begrenzung der Verfügbarkeit des δ -Endotoxins durch entwicklungs- oder gewebespezifische Expression des Gens im Mais verringert den Selektionsdruck.
- Der Einbau mehrerer unterschiedlicher *Bt*-Gene in eine transgene Pflanze (sog. „*gene stacking*“ oder Pyramidisierung) kann zu einer starken Verzögerung der Resistenzentwicklung führen (MÜLLER, 2001a; ANONYMUS, 1999).
- Auch eine Sortenmischung, die den Vorteil einer leichten Saatausbringung und Refugienkontrolle zur Folge hätte, könnte ein Prinzip des IRMs sein. Untersuchungen von SHELTON et al. (2000) haben jedoch an *Bt*-resistenten Kohlmotten *Plutella xylostella* gezeigt, dass eine separate Refugien-Fläche effizienter ist als eine Sortenmischung, die von RAUSHER (2001) positiv bewertet wurde. Bei Sortenmischungen können empfindliche Larven leicht von anfälligen zu resistenten Pflanzen wechseln, wo sie anschließend sterben. Damit wird der Anteil überlebender sensitiver Tiere verringert und somit dem Resistenzmanagement entgegengewirkt.
- Ein wechselnder Anbau von *Bt*-Sorten mit unterschiedlichen Toxingenen kann verhindern, dass die Nachkommen resistenter Larven an *Bt*-Pflanzen mit anderem Toxin überleben. Des Weiteren kann durch eine Mischung von Pflanzen mit unterschiedlichen *Bt*-Toxinen einer möglichen Entwicklung von Kreuzresistenzen vorgebeugt werden (MCGAUGHEY, 1994).

Noch problematischer ist die Entwicklung von Kreuzresistenzen gegen mehrere *Bt*-Toxine bei Zielorganismen. Beobachtungen bei *Plutella xylostella* haben erste Anzeichen von einer Kreuzresistenz aufgezeigt. Versuche von TABASHNIK et al. (1997) ergaben, dass ein einziges Gen die Resistenz gegen vier Toxine bewirken kann. Solch eine Kreuzresistenz würde dazu führen, dass *Bt*-Sorten ihre Wirkung verlieren und dann wieder zu konventionellen Methoden, wie der Bodenbearbeitung, dem Einsatz von Schlupfwespen und Pflanzenschutzmitteln, zurückgegriffen werden müsste.

Zur Überwachung der Effizienz des IRMs müssen geeignete Monitoring-Methoden eingesetzt werden. Neben der Aktualisierung der Werte für die Empfindlichkeit von *O. nubilalis* für *Bt*-Toxine auf Grundlage der vor dem Anbau ermittelten Basisempfindlichkeit (LC₅₀) dienen populationsgenetische Informationen der Abschätzung von Gendrift, d. h.

der Vermischung von Populationen und der Ausbreitung von Resistenzgenen in benachbarte Befallsgebiete.

1.4 Genetische Charakterisierung von Insektenpopulationen

Bevor eine genetische Charakterisierung von Insektenpopulationen durchgeführt wird, muss zunächst einmal der Begriff „Population“ definiert werden. Unter einer Population wird eine Gruppe von Organismen derselben Art bezeichnet, die ein mehr oder weniger genau definiertes geographisches Gebiet besetzt, einen gemeinsamen Genpool besitzt und von Generation zu Generation Fortpflanzungskontinuität aufweist. Die Population wiederum setzt sich aus kleinen lokalen panmiktischen Populationen zusammen, die als Deme, Subpopulationen oder Lokalpopulationen bezeichnet werden.

Zur genetischen Charakterisierung von Insektenpopulationen stehen sowohl Marker von Genprodukten (Proteinmarker) als auch **DNA-Marker** zur Verfügung. Bei den **Proteinmarkern** unterscheidet man zwischen Alloenzymen (unterschiedliche Substratspezifität, aber vom gleichen Genort) und Isoenzymen (identische Substratspezifität, aber unterschiedliche Genorte), die in vielen Insektengruppen bspw. innerhalb der Lepidopteren für *Hemileuca oliviae* (DUBACH et al., 1988) und *Spodoptera frugiperda* (PASHLEY et al., 1985) für populationsbiologische Studien herangezogen wurden. Alloenzyme, die seit 1966 ein breites Anwendungsgebiet in allen Tier- und Pflanzengruppen erreichten, sind meist billiger und schneller zu testen als DNA-Marker (LOXDALE & LUSHAI, 1998), aber sie sind dennoch kritischer zu bewerten, da äußere Einflüsse ihre Expression verändern können (LINNERT & ODENBACH, 1997). Gegenwärtig nimmt die DNA-Technik dank der Entwicklung der *Polymerase Kettenreaktion* (*Polymerase Chain Reaction, PCR*) und der Verwendbarkeit unterschiedlicher Ausgangsmaterialien (Alkoholfixierung, Lufttrocknung, Fossilien) eine bedeutendere Stellung im Gebiet der Populationsgenetik gegenüber den Enzymen ein (LEWIN, 1994). Für molekulare Populationsstudien bei Insekten werden spezifische und unspezifische Abschnitte der genomischen DNA (Zellkern) und DNA der Mitochondrien (mtDNA) herangezogen. Gene, die für ribosomale RNA (rDNA) kodieren und die mitochondriale DNA (mtDNA) eignen sich besonders gut zur Charakterisierung auf Artebene, da sie im Laufe der Evolution wesentlich geringeren Veränderungen unterworfen waren als andere DNA-Bereiche (TAYLOR, 1986; JORGENSEN & CLUSTER, 1989; KREITMAN, 1991 zitiert in: HERING, 1997).

Die **mtDNA** ist einer der besten Marker für phylogenetische Beziehungen von nahe verwandten Gruppen von Insekten (DESALLE et al., 1978; BECKENBACH et al., 1993 zitiert in: KIM et al., 1999). So untersuchten KIM et al. (1999) die mtDNA von sieben *Ostrinia*-Arten aus Japan und einer Art aus Nordamerika. Es zeigte sich, dass die COII Sequenz die phylogenetischen Beziehungen der *Ostrinia*-Arten gut charakterisiert. Allerdings stimmten diese nicht mit der taxonomischen Klassifikation der *Ostrinia*-Arten mittels Beschreibung der Tiben überein.

Innerhalb der genomischen DNA befindet sich die ribosomale DNA (**rDNA**), die in variable Bereiche u. a. die *Internal Transcribed Spacer* (ITS-1 und -2) und in hoch konservierte kodierende Bereiche (5,8S rDNA, 18S rDNA und 28S rDNA) gegliedert wird. Die ITS-1 und -2-Abschnitte dienen ebenfalls als molekulare Marker für intra- und interspezifische Beziehungen von nahe verwandten Arten der Insekten und Arthropoden (PORTER & COLLINS, 1991; PASKEWITZ et al., 1993 zitiert in: CLARK et al., 2001).

Wie die Zusammenstellung von SILVA & RUSSO (2000) zeigt, wurden in dem Zeitraum von 1979 – 1997 im Bereich der Populationsbiologie 54 % der veröffentlichten Untersuchungen mit mitochondrialer DNA, 41 % mit genomischer DNA und 5 % mit Chloroplasten-DNA durchgeführt. Der Anteil auf rDNA basierender Untersuchungen innerhalb der genomischen DNA wurde nicht angegeben. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die rDNA einen nicht unerheblichen Anteil in der Populationsbiologie ausmacht.

Unter den zahlreichen Methoden für populationsgenetische Untersuchungen wurde die RFLP mit 44 % am häufigsten eingesetzt, gefolgt von 18 % Sequenzierung, 14 % RAPD-PCR, 10 % Fingerprinting, 8 % Mikrosatelliten, 5 % *Variable Number of Tandem Repeats* (VNTR) und 1 % Denaturierung. Zur Technik der Denaturierung zählen die *Single-Strand Conformation Polymorphism* (SSCP), die *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE), *Temperature Gradient Gel Electrophoresis* (TGGE), und Heteroduplexing. Seit Ende der 90er Jahre wurden verstärkt die Methoden der *Amplified Fragment Length Polymorphisms* (AFLP), *Sequence-Specific Oligonucleotides* (SSO) und Mikrosatelliten für populationsgenetische Studien herangezogen. Neben den Alloenzymen können nur die *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) und Mikrosatelliten-Methoden homozygote von heterozygoten Fragmenten unterscheiden (SILVA & RUSSO, 2000). Alle anderen Marker (RAPD, AFLP u. a.) sind dominant und können damit diesen Unterschied nicht aufzeigen.

Die **PCR** ist eine *in vitro*-Technik, mit der gezielt Desoxyribonucleeinsäure-(DNA)-Abschnitte mit Hilfe von Primern aus einem heterogenen Gemisch amplifiziert, d. h. vervielfältigt, werden können. Ein Reaktionszyklus der PCR ist durch drei aufeinander folgende Schritte gekennzeichnet: Denaturierung der DNA durch Erhitzen auf ca. 92 °C – 94 °C; nach schneller Temperatursenkung auf ca. 50 °C – 60 °C hybridisieren die Primer mit den komplementären Sequenzen der Einzelstränge (Primerannealing); anschließend werden die Einzelstränge bei ca. 72° C mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase zur doppelsträngigen DNA ergänzt (DNA-Amplifikation oder Primerextension); durch 30fache bis 40fache Wiederholung dieses Reaktionszyklus werden DNA-Vervielfältigungen von 10³ bis 10⁶ erreicht. Es gibt drei unterschiedliche Fingerprinting-Methoden, die durch eine zufällige Amplifikation verschiedene PCR-Fragmente erzeugen. Der Unterschied zwischen den Methoden besteht in den variablen Nukleotidlängen der eingesetzten Primer. Bei der RAPD-PCR von WILLIAMS et al. (1990) werden Primer mit einer Länge von 10 – 12 Basen und mit einem G/C-Gehalt von mindestens 50 % verwendet. Eine von WELSH & MCCLELLAND (1990) beschriebene Technik wird als AP-PCR (*arbitrarily primed*) bezeichnet, die sich durch längere Primer (z. B. 20 Basen oder Universal-Primer M13 mit 17 Basen) auszeichnet. Die dritte als DAF-PCR (*DNA amplification fingerprinting*) von CAETANO-ANOLLES et al. (1991) beschriebene Methode verwendet Primer mit einer Länge von 5 bis 8 Basen. Bei allen drei Methoden führt ein Abstand der Primer auf einem DNA-Strang von größer 2 kb bis 3 kb zu einem Abbruch der Amplifikation durch die Polymerase (WILKERSON et al., 1993), so dass die PCR-Fragmente meist Größen zwischen 0,1 kb bis 2 kb erreichen.

Durch die PCR-Amplifikation können genetische Polymorphismen aufgedeckt werden, die sich durch das Vorliegen mehrerer Ausfertigungen einer genetischen Struktur (LINNERT & ODENBACH, 1997), d. h. durch die An- bzw. Abwesenheit von spezifischen Fragmenten, auszeichnen. Diese können durch Punktmutationen an einer oder mehreren Positionen der Primer-Bindungsstellen, durch Inversionen, Insertionen oder Deletionen auftreten.

Die **RAPD-PCR** war bei den hier vorliegenden Untersuchungen zur Populationsgenetik von *O. nubilalis* die dominierende Methode, da sie gegenüber anderen PCR-Methoden viele Vorteile besitzt und bei einer Vielzahl von Pflanzen und Tieren für populationsgenetische Analysen eingesetzt wird. So wurden RAPD-Primer bspw. bei Bakterien wie *Xanthomonas campestris* (SMITH et al., 1994), bei Pilzen wie *Hypoxylon truncatum* (YOON & GLAWE, 1993) und *Beauveria brongniartii* (CRAVANZOLA et al., 1997), bei Pflanzen wie *Picea glauca* (CARLSON et al., 1991) und *Juniperus procera*

excelsa (ADAMS et al., 1993), bei Vertebraten wie Fische (SCHEIDER et al., 1997) und bei Invertebraten wie die Nematelminthen *Globodera* spp. (PASTRIK, 1995; PASTRIK et al., 1995) und vielen Insektenarten verwendet. In der Referenz-Liste (ISI Web of Science) sind beim Screening „RAPD-PCR“ 735 Einträge registriert worden. Innerhalb der Insekten sind bei den folgenden Ordnungen besonders viele RAPD-Arbeiten durchgeführt worden, für die beispielhaft einige aufgeführt werden:

- Homoptera z. B. die Weiße Fliege *Bemisia tabaci* - ein wirtschaftlich bedeutender Schädling und Vektor von Pflanzenvirosen (MOYA et al., 2001; LIMA et al., 2000; DE BARRO & DRIVER, 1997; WU et al., 2002), Blattläuse wie *Acyrtosiphon pisum* (HOMMEL & PACHOLSKY, 1996);
- Diptera z. B. Stechmücken wie *Aedes aegypti*, *A. formosus* (BALLINGER-CRABTREE et al., 1992), *Anopheles gambiae*, *A. arabiensis* (WILKERSON et al., 1993);
- Hymenoptera z. B. Wespen wie *Trichogramma* spp. (BARNAY et al., 2001), *Cephus cinctus* (LOU et al., 1998) und *Trioxys pallidus* (EDWARD & HOY, 1995);
- Lepidoptera z. B. den Schwammspinner *Lymantria dispar* (REINEKE, 1998; GRASER et al., 1995), den Maiszünsler *Ostrina nubilalis* (PORKULWAT et al., 1998) und die Dörrobstmotte *Plodia interpunctella* (DOWDY & MCGAUGHEY, 1996);
- Coleoptera z. B. *Naupactus leucoloma*, *N. peregrinus*, *N. tucumanensis* (HARDWICK et al., 1997).

Die RAPD-PCR unterscheidet sich von einer spezifischen PCR durch die Verwendung nur eines RAPD-Primers mit 9 oder 10 Basen mit einer niedrigen Annealingtemperatur von 35 °C – 39 °C statt zweier verschiedener Primer mit einer Anzahl von 18 – 30 Basen und einer Annealingtemperatur von 50 °C – 55 °C (BOWDITCH et al., 1993). Die Abbildung 6 zeigt schematisch den Ablauf der RAPD-PCR.

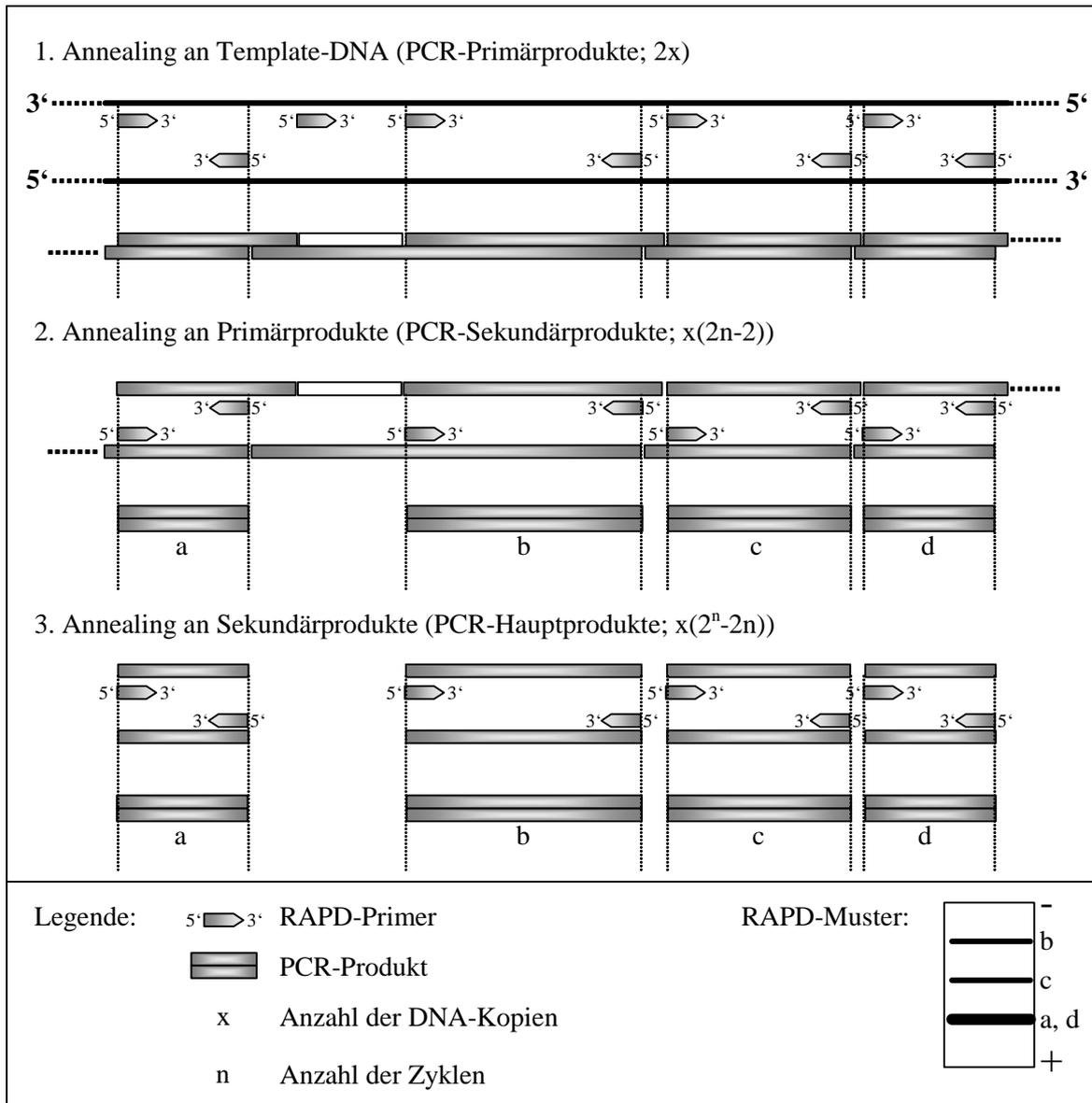


Abb. 6: Schema der RAPD-PCR

Die RAPD-PCR eines komplexen Genoms produziert eine Anzahl von 2 – 10 anonymen aber meist gut reproduzierbaren Banden mit einer Größe von 400 bp – 2000 bp (BOWDITCH et al., 1993). Die Technik der RAPD-PCR ist leicht und schnell zu erlernen und anzuwenden. Sie benötigt keine Sequenzinformation, geringe DNA-Mengen, ist relativ kostengünstig und wird als genetischer und taxonomischer Marker von Eu- und Prokaryonten benutzt (TINGEY & TUFO, 1993). Sie gibt aber allerdings wenig bis keine Auskunft über die Phylogenie von verschiedenen Taxa, da die konservierten DNA-Abschnitte wie die mtDNA und rDNA nur ungenügend von RAPD-Primern erfasst werden. Die Fingerprints bei der RAPD-PCR werden auf Gattungs-, Art- und Individuenebene angewendet (HADRYIS et al., 1992). So wurde mit der RAPD-PCR bei der

Käfergattung *Naupactus* zwischen Arten und Populationen differenziert (HARDWICK et al., 1997), bei den Schwammspinnern *Lymantria dispar* zwischen Rassen und Populationen (GRASER, 1996), bei der Mückengattung *Aedes* zwischen Unterarten und Populationen (BALLINGER-CRABTREE et al., 1992) und bei dem Maiszünsler *O. nubilalis* zwischen Ökotypen (PORNKULWAT et al., 1998). Bei der Weißen Fliege *Bemisia tabaci* wurde festgestellt, dass Biotypen einer Art keine engere genetische Ähnlichkeit gegenüber anderen Arten besitzen und daher ein Einsatz der RAPD-PCR für eine höhere Klassifikation der Insekten nicht sinnvoll ist (GAWEL & BARTLETT, 1993). Weiterhin wird die RAPD-PCR für Verwandtschaftsanalysen und zum Monitoring natürlicher Feinde von Schädlingen eingesetzt (HOY, 1994).

Die RAPD-PCR kann alle Arten von Mutationen, wie Substitution, Insertion, Deletion und Inversion, erfassen. Mutationen können im Bereich der Primerbindungen, durch Verhinderung der Primeranlagerung, als auch außerhalb dieser als eine Form des Polymorphismus sichtbar werden. Durch die niedrigen Annealingtemperaturen kann es leicht zur Ausbildung von Sekundärstrukturen innerhalb der Einzelstrang-Templates kommen, die die Bindung der Primer oder die Elongation der Taq-Polymerase verhindern können. Die amplifizierte PCR-Fragmente geben weder Auskunft über die Quantität der Sequenz noch darüber, ob es sich um heterozygote oder homozygote Allele handelt. RAPD-Fragmente sind daher dominante Marker (BLACK, 1993). Es ist jedoch theoretisch möglich, anhand der unterschiedlichen Menge der Amplifikationsprodukte zwischen Homozygotie (zwei Kopien) und Heterozygotie (eine Kopie) zu unterscheiden (BÜSCHER & ZYPRIAN, 1994). Die Codominanz der Allele wird nur selten aufgedeckt, so fand bspw. WILLIAMS et al. (1990) nur vier codominante Marker von 88 RAPD-Polymorphismen im Genom des Pilzes *Neurospora crassa*.

Im Vergleich zu der **Alloenzym-Elektrophorese** wird mit der RAPD-PCR eine größere genetische Variation erfasst (BLACK, 1993; BLACK et al., 1992). So wurde bei der Bestimmung der genetischen Variation zwischen geographisch verschiedenen Schmetterlings-Populationen von *Boloria aquilonaris* eine größere Mutationsrate mit der RAPD-PCR gegenüber den Alloenzymen nachgewiesen (VANDEWOESTIJNE & BAGUETTE, 2002). Andererseits ist die RAPD teurer und dauert länger als die Alloenzym-Elektrophorese (DE BARRO & Driver, 1997).

Die RAPD-PCR deckt gegenüber der älteren **RFLP-Technologie** vier bis sechsmal mehr Polymorphismen auf und ist 10fach effektiver in der Zeit (TINGEY & TUFO, 1993). SUN et

al. (1999) zeigten mit den drei Methoden **Isoenzym-Elektrophorese**, RAPD-PCR und **Mikrosatelliten-Methode** zur Untersuchung der genetischen Diversität der Graminee *Elymus caninus*, dass die RAPD-PCR mehr Variationen als die Isoenzyme aufzeigt, jedoch Mikrosatelliten den höchsten Grad an Polymorphismus erbringen.

1.5 Zielsetzung

In Vorbereitung auf einen erwarteten Anbau von *Bt*-Mais in Deutschland wurden im Programm „BioMonitor“ des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) mehrere abgestimmte Projekte der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin und Braunschweig (BBA) und der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule (RWTH) Aachen im Zeitraum von 1999 bis 2002 unter den Kennzeichen BEO/0312165 bzw. BEO/0312175 gefördert (<http://www.ptj-jahresbericht.de>). Auf der Grundlage von mehreren lokalen *O. nubilalis*-Populationen aus verschiedenen deutschen Befallsgebieten bestanden die Projektziele beider Partner **1.** in der Ermittlung der Basisempfindlichkeit von *O. nubilalis* für das Cry1Ab Toxin und **2.** in der Bestimmung der genetischen Ähnlichkeit von ausgewählten Lokalpopulationen.

Die Ergebnisse der umfangreichen Biotests zur Basisempfindlichkeit wurden in der hier vorgelegten Dissertation nicht aufgenommen. Sie wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Langenbruch vom Institut für Biologischen Pflanzenschutz der BBA in Darmstadt durchgeführt und werden in einer gemeinsamen Publikation veröffentlicht.

Für molekulargenetische Fragestellungen zur genetischen Ähnlichkeit von Populationen und Rassen stehen generell mehrere molekulargenetische Methoden auf der Grundlage der PCR zur Verfügung (siehe Kapitel 1.4). An der RWTH Aachen wurde die AFLP-Methode und am Institut für integrierten Pflanzenschutz der BBA in Kleinmachnow die RAPD-Technik in den Mittelpunkt der Untersuchungen gestellt, um sie später in einer gemeinsamen Auswertung zusammen zu führen.

In der vorliegenden Arbeit werden auf der Grundlage der **RAPD-Muster** folgende Fragen zur Populationsgenetik von *O. nubilalis* beantwortet:

- 1) Stellen Befallsgebiete von *O. nubilalis* in Deutschland isolierte Populationen mit einem gemeinsamen Genpool dar? Wird die genetische Ähnlichkeit von *O. nubilalis*-Populationen durch Genfluss verändert?

- 2) Welche mögliche Ausbreitung zwischen den Populationen über Migration könnte eine *Bt*-Resistenz von *O. nubilalis* nehmen? Welche Monitoringmethoden sind zur Beobachtung dieser Ausbreitung notwendig?
- 3) Welche Schlussfolgerungen ergeben sich aus den RAPD-Untersuchungen für das IRM und sein Monitoring?

Für die eigentlichen Untersuchungen zur Generierung von RAPD-Mustern der ausgewählten lokalen Populationen mussten spezielle methodische Voraussetzungen erst abgeklärt werden:

- Welche DNA-Extraktionsmethode ist einfach durchführbar, gut reproduzierbar und führt zu guten PCR-Ergebnissen?
- Welche Reaktionsbedingungen müssen eingestellt werden, um optimale Ergebnisse in der RAPD-PCR zu erhalten? Wie groß muss die Anzahl an RAPD-Markern sein, um die genetischen Unterschiede zwischen den Herkünften genau zu erfassen?
- Welche Feldgröße und welcher Feldbereich sind für eine repräsentative Auswahl an Individuen erforderlich, um eine Lokalpopulation ausreichend zu beschreiben?
- Können für die populationsgenetischen Untersuchungen auch Tiere aus bestehenden Laborzuchten herangezogen werden, oder repräsentieren sie dann nur noch einen Teil der ursprünglichen genetischen Vielfalt? Welchen Einfluss haben Geschwister in einer ausgewählten lokalen Populationsprobe auf die RAPD-Muster?
- Welche in der PCR eingesetzte Template-DNA aus Einzeltieren oder Tiergruppen führt zu charakteristischen RAPD-Mustern der Lokalpopulation?
- Wie verändert sich das RAPD-Muster bei einer Mischung von Larven der E- und Z-Rasse gegenüber Larven aus der Z-Rasse?

Zur genetischen Charakterisierung der lokalen *O. nubilalis*-Populationen und –Rassen aus Deutschland sind außer der RAPD-PCR weitere molekulargenetische Methoden für folgende Fragestellungen herangezogen worden:

- Gelingt mit dem *Internal Transcribed Spacer-Restriction Fragment Length Polymorphism* (ITS-RFLP), der *Temperature Gradient Gel Electrophoresis* (TGGE) und mit der Sequenzierung des ITS-1-Fragments eine Unterscheidung der beiden *O. nubilalis*-Rassen Z und E?

- Tragen Untersuchungen zu den im Darm von *O. nubilalis* assoziierten Bakteriengesellschaften mit Hilfe des *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism* (T-RFLP) zur Verifizierung der mit der RAPD-PCR ermittelten genetischen Ähnlichkeiten der Populationen bei?

Aufgrund der großen Gefahr einer Resistenzentwicklung bei hohem Selektionsdruck durch den *Bt*-Mais ist ein weiteres, aber eher strategisches Ziel, über RAPD- oder AFLP-Muster, über ITS-Sequenzen vor und nach einer Resistenz-Selektion resistenzspezifische Fragmente zu detektieren, die dann zu resistenzspezifischen Primern weiterentwickelt werden können. Somit können die in dieser Arbeit entwickelten Differenzierungstechniken bei einem Auftreten resistenter Tiere einen Beitrag zur Auffindung von Resistenzmarkern leisten.

2 MATERIAL und METHODEN

2.1 Herkunft der lokalen *O. nubilalis*-Populationen

Für die Gewinnung der DNA sind aus verschiedenen deutschen Maisanbaugebieten, in denen schon seit Beginn des 20. Jh. Mais angebaut wird, Larven von *O. nubilalis* gesammelt worden. Die Standorte befinden sich sowohl in den alten südlich gelegenen *O. nubilalis*-Befallsgebieten, als auch in Gebieten, in denen sich *O. nubilalis* erst vor wenigen Jahren, z. B. um Bonn, etabliert hat. Bei der Auswahl der deutschen Standorte wurden besonders die starken Befallsgebiete berücksichtigt und die Larven von *O. nubilalis* aus diesen Gebieten in die populationsgenetischen Untersuchungen einbezogen. Die Tab. 2 zeigt eine Übersicht über die ausgewählten Standorte in Deutschland. Sie enthält eine kurze Charakteristik über deren Lage, Umfang und Nutzungsrichtung des derzeitigen Maisanbaus im jeweiligen Bundesland sowie den potentiellen Gefährdungsgrad für den *O. nubilalis*-Befall, der unter den verschiedenen klimatischen, geographischen und anbautechnischen Bedingungen von KLUGE et al. (1999) kalkuliert wurde.

Tab. 2: Maisanbau und potentielle *O. nubilalis*-Gefährdung der ausgewählten deutschen Standorte

Standort	Bundesland	Maisanbau [1000 ha]		Gefährdungsklasse nach KLUGE et al. (1999)
		Körner- & CCM- Mais	Silomais	
Oderbruch	Brandenburg	16,2	95,2	stark
Halle	Sachsen-Anhalt	21,9	59,3	stark
Niedernberg	Bayern	117,2	285,4	stark
Pocking				stark
Hessisches	Hessen	5,8	24,0	sehr stark
Bonn	Nordrhein-Westfalen	35,4	126,8	sehr stark
Freiburg	Baden-Württemberg	71,8	68,1	sehr stark
Bodensee				stark
Karlsruhe				mittel – stark

(ANONYMUS, 2003b)

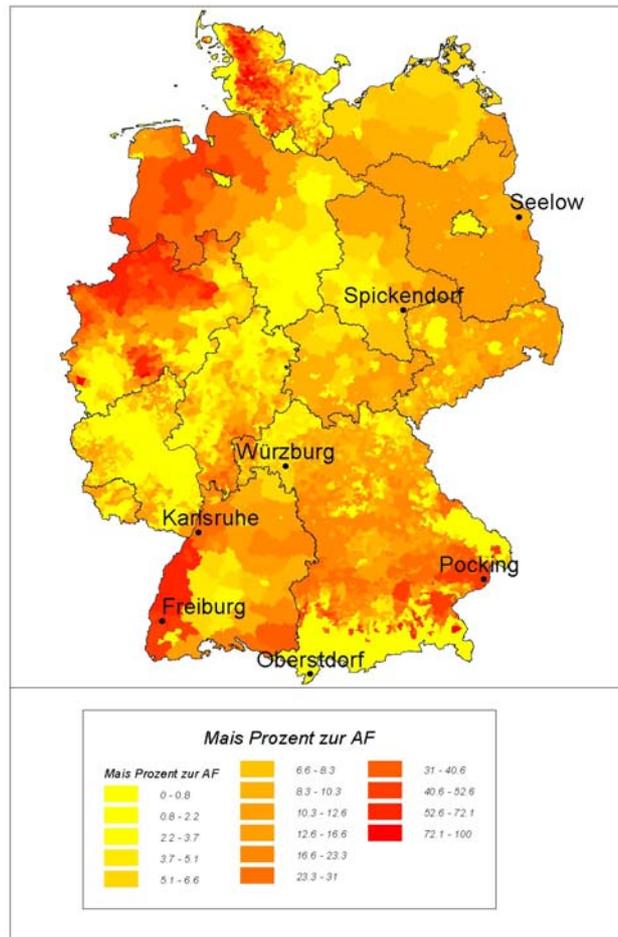


Abb. 7: Intensität des Maisanbaus in Deutschland im Jahr 2003 (pers. Mitt. ENZIAN, 2004)

Da die Grenzen einer Population bzw. Lokalpopulation teilweise von der Absicht des Forschers und dem Ziel der Untersuchung entsprechend willkürlich festgelegt werden können (BEGON et al., 1991), wurden die in der vorliegenden Arbeit ausgewählten Standorte als Lokalpopulationen bezeichnet. Welche Lokalpopulationen zu einer Population zusammengefasst werden können, sollen die nachfolgenden molekularbiologischen Arbeiten zeigen. In der Abb. 8 sind alle Lokalpopulationen der Z-Rasse, die in dieser Arbeit verwendet wurden, in einer Karte eingezeichnet und ihre jeweilige topographische Lage ist in einer darunter befindlichen Tabelle zusammengefasst. Für die Untersuchung des Einflusses der E-Rasse auf die RAPD-Muster der Z-Rasse ist zusätzlich eine Teilpopulation der E-Rasse vom Standort Bonn aus Beifuss *Artemisia vulgaris* gesammelt worden.



Nr. in der Karte	Standort	Breitengrad	Längengrad	Entfernung zum Oderbruch [km]
1	Oderbruch	52,538 N	14,429 O	-
2	Halle	51,549 N	12,150 O	180
3	Pocking	48,424 N	13,308 O	460
4	Hessisches Ried	49,807 N	8,550 O	500
5	Niedernberg	49,958 N	9,115 O	460
6	Karlsruhe	49,023 N	8,424 O	575
7	Freiburg	48,011 N	7,852 O	680
8	Bonn	50,732 N	7,096 O	540
9	Bodensee	47,685 N	9,412 O	640
10	Przemysl	49,739 N	22,841 O	660
11	Monbequi	43,610 N	1,463 O	1370

Abb. 8: Geografische Lage der ausgewählten 11 Sammelstandorte für *O. nubilalis*-Larven, davon neun in Deutschland (1–9), einer in Polen (10) und einer in Frankreich (11)

Die klimatische Charakterisierung der ausgewählten deutschen Standorte in Bezug auf Temperatur- und Niederschlagswerte beziehen sich auf die drei Untersuchungsjahre von 1999 – 2001 (Abb. 9) und langjährige klimatische Mittelwerte (Tab. 3). Für die Charakterisierung der Standorte in Polen und Frankreich wurden nur die langjährigen klimatischen Mittelwerte herangezogen. Bei diesen Standorten ist zu beachten, dass

gegenüber den deutschen Standorten andere Zeitperioden und eine andere Zeitdauer für die Klimadaten zur Verfügung standen.

Tab. 3: Langjährige Temperatur- und Niederschlagsmittelwerte der Sammelstandorte unter besonderer Berücksichtigung der Monate Juni bis September für den Falterflug und die Larvenentwicklung sowie November bis Februar für die Diapause der Larven

Standorte	Jahre	Temperatur [°C]			Niederschlag [mm]			Messstation	
		Jahr	VI-IX	XI-II	Jahr	XI-II	VI-IX	Name	NN
Oderbruch	1961-1990	8,6	16,5	0,8	563,0	41,8	55,5	Lindenberg	98 m
Halle	1961-1990	8,5	16,2	1,1	455,2	29,0	48,9	Artern	164 m
Pocking	1961-1990	8,0	15,9	-2,9	936,6	72,7	92,1	Passau-Oberhaus	409 m
Hessisches Ried	1961-1990	10,2	17,8	2,8	667,6	45,2	66,7	Mannheim	96 m
Niedernberg	1961-1990	9,1	16,8	0,5	602,2	46,8	56,5	Würzburg	268 m
Karlsruhe	1961-1990	10,3	17,8	2,8	769,8	60,7	68,9	Karlsruhe	112 m
Freiburg	1961-1990	10,7	18,2	3,3	954,8	63,0	96,6	Freiburg	269 m
Bonn	1961-1990	9,7	16,1	3,7	828,3	66,0	74,3	Aachen	202 m
Bodensee	1961-1990	6,1	13,7	-1,2	1831,3	132,3	194,4	Oberstdorf	810 m
Przemysl	1951-1960	8,0	17,1	-1,0	658,8	36,5	82	Przemysl	237 m
Monbequi	1931-1960	12,7	19,7	6,1	658,8	53,3	55,8	Toulouse-Blagnac	152 m

Quelle: Klimadaten von Deutschland von MÜLLER-WESTERMEIER (1996); Przemysl von BAUCUS & KALB (1982); Monbequi von KALB & NOLL (1990)

Die klimatischen Bedingungen der untersuchten Lokalpopulationen aus den jeweiligen Jahren sind in der Abbildung 9 dargestellt. Sie decken sich nur zum Teil mit den Klimadaten aus dem langjährigen Mittel.

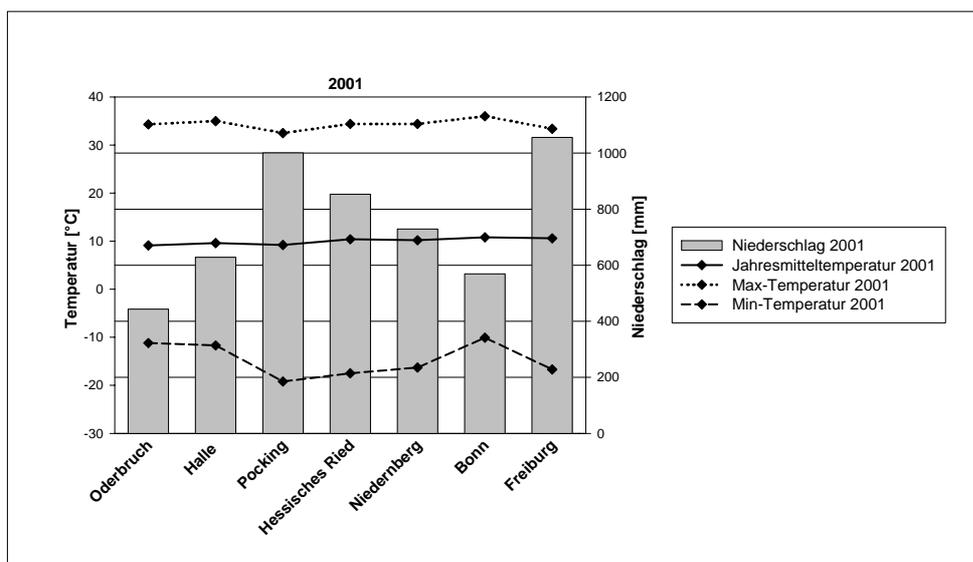
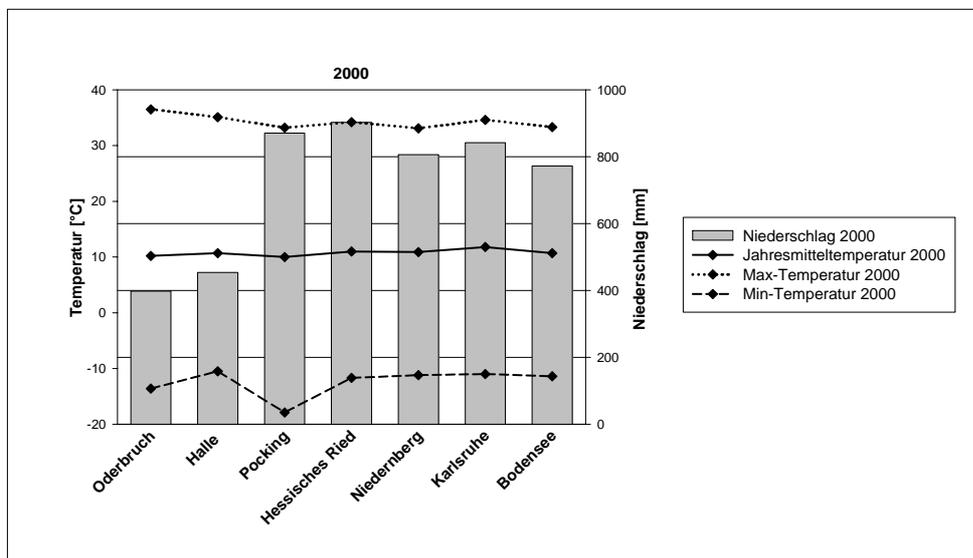
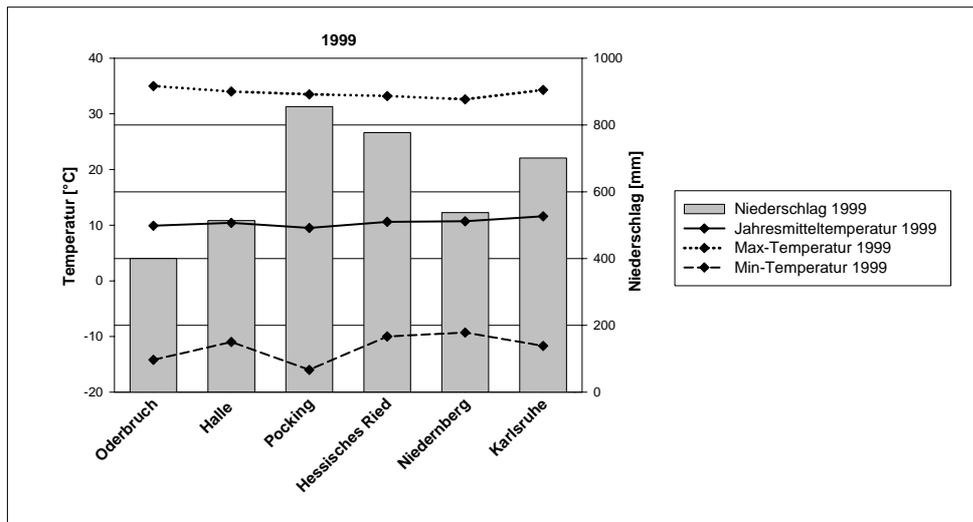


Abb. 9: Mittleres Jahresklima an den deutschen *O. nubilalis*-Standorten in den Jahren 1999, 2000 und 2001

Deutsche Lokalpopulationen

Oderbruch (12 m über NN):

Das Oderbruch, das von allen Standorten den tiefsten Lagepunkt besitzt, ist durch ein stark kontinental beeinflusstes Binnenlandklima, mit einer häufig auftretenden Vorsommertrockenheit gekennzeichnet. Es hatte gegenüber den anderen untersuchten deutschen Standorten in den Jahren 1999 – 2001 ganzjährig die geringsten Niederschläge und nach Pocking die zweitniedrigsten Temperaturen zu verzeichnen. Dies bestätigt sich auch in den langjährigen klimatischen Mittelwerten. Von 1965 – 1975 wurde das Moor in diesem Gebiet umgebrochen und ein intensiver Maisanbau besonders von Silomais betrieben. Schon nach wenigen Jahren konnte der schwere Alluvialboden (Schwemmland) nicht mehr gepflügt werden. Auch heute wird nach der Maisernte, hauptsächlich wegen des vorhandenen tonigen Bodens, kaum gepflügt. Ab dem Jahr 1985 wurden die ersten Zünsler von *O. nubilalis* im Oderbruch registriert und zwei Jahre später gezielte Untersuchungen durchgeführt, die von POPKO (1988) veröffentlicht wurden. Der Anteil befallener Pflanzen lag durchschnittlich bei 10,6 %.

Halle (76 m über NN):

Der Standort Halle, der ebenfalls zur kontinentalen Region zählt, war in den drei untersuchten Jahren durch harte Winter, teilweise heiße Sommer und eine ganzjährig niedrige Niederschlagsmenge gegenüber den anderen Standorten - ausgenommen Oderbruch - gekennzeichnet. Die langjährigen Mittelwerte sind mit dem Standort Oderbruch vergleichbar, wobei die Niederschlagsmenge in dieser Region etwas höher war. Auch in diesem Gebiet wird häufig ein pflugloser Maisanbau, bedingt durch eine Kostenoptimierung der Betriebe und spezielle Fördermaßnahmen der Bundesländer aus ökologischen und ökonomischen Gründen (Erosionsminderung, Dieseleinsparung), betrieben. Ähnlich wie im Oderbruch wird bedeutend mehr Silo- als Körnermais angebaut.

Pocking (325 m über NN):

Die Region Pocking ist durch ein kontinentales Klima charakterisiert, welches ähnlich hohe Niederschlagsmengen wie die alten süddeutschen Befallsgebiete erreicht. Es besaß von allen Standorten die geringste Jahresmitteltemperatur, die mit der Region Oderbruch vergleichbar ist. Die langjährigen Temperaturmittelwerte können mit den Standorten Oderbruch und Halle verglichen werden. Die langjährigen Niederschlagsmengen sind jedoch eher mit dem Standort Freiburg zu vergleichen. Die Böden sind steinig, leicht erwärmbar und stellen einen idealen Maisstandort dar. Im Bezirk des

Landwirtschaftsamt Rothalmünster wird *O. nubilalis* ausschließlich mechanisch durch Schlegeln der Stoppeln und durch sauberes Unterpflügen des Pflanzenmaterials bekämpft.

Hessisches Ried (162 m über NN):

Das Hessische Ried ist durch milde Winter und warme Sommer charakterisiert. Es zählt zu den regenarmen Regionen Deutschlands mit einer relativ hohen Verdunstung. Die Temperaturen waren in den Jahren 1999 - 2001 nur minimal höher als in Niedernberg. Bedeutend höher fielen die Niederschlagsmengen gegenüber Niedernberg aus und waren besonders im südlichen Bereich um mehr als das Doppelte höher als in der kontinentalen Region um Oderbruch und um Halle. Die langjährigen Mittelwerte weisen bei den Temperaturen im Vergleich zu Karlsruhe eine starke Ähnlichkeit auf. Die Niederschlagsmengen, die im langjährigen Mittel niedriger sind als in Karlsruhe, zeigten in den drei Untersuchungsjahren ein umgekehrtes Verhältnis. In der Landwirtschaft wird hauptsächlich Ackerbau aber auch Gemüsebau betrieben. Die Feldflächen sind meist sehr klein und stark zersplittert. Beim Maisanbau handelt es sich überwiegend um Silomais. Über die Bekämpfungsmöglichkeit im Hessischen Ried liegen keine Daten vor, es kann aber davon ausgegangen werden, dass zum Teil Insektizide und *Trichogramma* spp. eingesetzt werden. Nach der Maisernte erfolgt kaum eine mechanische Bekämpfung. Dies trägt dazu bei, dass sich das Hessische Ried nach KLUGE et al. (1999) in die sehr starke Gefährdungsklasse einordnet.

Niedernberg (155 m über NN):

Der Standort Niedernberg ordnet sich von allen untersuchten Standorten bei den Temperatur- und Niederschlagsverhältnissen im Mittelfeld ein, d. h. es hatte gegenüber den alten süddeutschen Befallsgebieten niedrigere Temperaturen und Niederschläge, aber bedeutend höhere als die Standorte Oderbruch, Halle und Bonn. Der Boden ist sandig und besteht aus Schotter und z. T. aus Löß. Er wird nach der Maisernte in diesem Gebiet überwiegend gepflügt. Bei 16 % der Ackerfläche, die mit Getreide angebaut wird, handelt es sich um Körnermais.

Karlsruhe (112 m über NN):

Der Standort Karlsruhe hat neben Freiburg das höchste Jahresmittel der Lufttemperatur. Die Sommer waren stets warm, die Winter mild und die Niederschlagsmenge fiel niedriger als beim Standort Pocking, aber bedeutend höher als bei den Standorten Oderbruch und Halle aus. Die langjährigen Temperaturmittelwerte sind mit den Standorten Hessisches Ried und Freiburg vergleichbar. Bei den langjährigen Niederschlagsmengen wird eher eine Zwischenstellung zwischen den zuvor benannten Standorten eingenommen. Im gesamten

Bundesland Baden-Württemberg besteht ein ausgewogenes Verhältnis beim Anbau von Körner- und Silomais, d. h. 71,8 % Körnermais und 68,1 % Silomais (Tab. 2). Nach KLUGE et al. (1999) nimmt Karlsruhe eine mittlere bis starke *O. nubilalis*-Gefährdungsklasse ein.

Freiburg (203 m über NN):

Freiburg war durch heiße Sommer, milde Winter und ganzjährig hohe Niederschläge gekennzeichnet. Die langjährigen Klimawerte zeigen die höchsten Temperatur- und Niederschlagsmengen gegenüber den anderen untersuchten Standorten. Lediglich am Standorte Bodensee ist eine noch höhere Niederschlagsmenge zu verzeichnen. Die wichtigste Ackerkultur stellt der Körnermais auf mittlerweile rund 40 % der Ackerfläche dar. Meist werden, wie im Hessischen Ried, kleine Maisflächen bestellt. Durch die Schäden von *O. nubilalis* entstehen Ernteauffälle von über 20 %, das damit die Einteilung zum sehr stark gefährdeten Maiszünslergebiet nach KLUGE et al. (1999) rechtfertigt.

Bonn (160 m über NN):

Der Standort Bonn zeichnete sich durch milde Winter und warme bis heiße Sommer aus, die jedoch kühler waren als an den Standorten Karlsruhe und Freiburg. Ganzjährig waren nur geringe Niederschläge, ähnlich der Standorte Oderbruch und Halle, zu verzeichnen, die im langjährigen Mittel jedoch bedeutend höhere Werte aufzeigten. Die langjährigen Temperaturmittelwerte sind mit den Standorten Hessisches Ried und Karlsruhe zu vergleichen. Neben Bayern und Niedersachsen wird in diesem Gebiet der höchste Maisanbau betrieben. Im Jahre 2002 ist jedoch in ganz Nordrhein-Westfalen ein leichter Rückgang der Maisanbaufläche festgestellt worden. Bei der Bestellung der Maisfelder überwiegt der Anbau von Silomais.

Bodensee (443 m über NN):

Der Standort Bodensee, der von allen Standorten am höchsten liegt, zeichnete sich im Sommer durch kühlere Temperaturen gegenüber den anderen süddeutschen Standorten Freiburg und Karlsruhe aus. Im Winter herrschten kühle Temperaturen mit vielen Frosttagen, ähnlich wie beim Standort Oderbruch. Im Sommer wurden ähnlich hohe Niederschlagsmengen wie in Freiburg, im Winter jedoch niedrigere als in Freiburg und Karlsruhe erreicht. Die langjährigen Klimawerte geben die niedrigsten Temperaturen und die höchsten Niederschlagsmengen gegenüber allen anderen untersuchten Standorten an. Der Maisanbau erfolgt meist auf kleinen Flächen, bei denen in traditionellen Befallsgebieten des Körnermais-Anbaus Ernteauffälle von über 20 % eintreten können.

Europäische Lokalpopulationen

Des Weiteren wurden im Jahr 2002 zwei ausländische Lokalpopulationen berücksichtigt, die zum einen aus dem polnischen Przemysl (Gebiet Rzeszow) nahe der ukrainischen Grenze, und zum anderen aus dem französischen Ort Monbequi (50 km nordöstlich von Toulouse und ca. 25 km südöstlich von Montauban) stammten. Die klimatische Charakterisierung dieser beiden Standorte bezieht sich nur auf ein langjähriges Mittel.

Przemysl (279 m über NN):

Der Standort Przemysl zeichnet sich durch niedrige Jahresmitteltemperaturen ähnlich der Standorte Oderbruch, Halle und Pocking aus. Die Niederschlagsmenge liegt höher als bei den Standorten Oderbruch und Halle, aber größtenteils niedriger als in den südlichen Bereichen Deutschlands. Über den ersten sichtbaren Befall durch *O. nubilalis* im südöstlichen Teil Polens konnte keine Literaturquelle herangezogen werden, allerdings beschrieb KANIA (1968) von den Jahren 1954 - 1967 ein verstärktes Auftreten von *O. nubilalis* im südwestlichen Teil Polens. Dieses ist jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit unabhängig von dem östlichen Gebiet entstanden und geht eher auf Befallsgebiete in der Ukraine zurück.

Monbequi (153 m über NN):

In dem französischen Standort Monbequi nahe der Stadt Toulouse treten bedeutend höhere Jahresmitteltemperaturen auf als in allen anderen untersuchten deutschen Standorten, die sich besonders durch die hohen Temperaturen im Winter auszeichnen. Die jährlichen Niederschlagsmengen sind mit den Standorten Hessisches Ried und Niedernberg zu vergleichen. Der Standort Monbequi liegt ebenfalls in einem alten Befallsgebiet, in dem bereits um 1915 starke Schäden im Maisanbau auftraten (RIVES, 1919 zitiert in: WILKE, 1926).

2.2 Probenentnahme an den Standorten

Die Probenentnahme der *O. nubilalis*-Larven von den verschiedenen Flächen an den einzelnen Standorten erfolgte nach unterschiedlichen Methoden. Im Oderbruch sind in zwei aufeinander folgenden Jahren 1999 in Golzow und 2000 in Seelow auf jeweils einem großen Feld von ca. 30 ha bzw. 70 ha *O. nubilalis*-Larven gesammelt worden. Im Jahr 2001 erfolgte in Gusow die Larvensammlung auf einem kleinen Feld von ca. 2,2 ha. Die Abbildung 10 zeigt die Distanzen der einzelnen Standorte zueinander und gibt die Größe

der Beprobungsfläche für den Gesamtstandort Oderbruch über einen Zeitraum von drei Jahren an.

In den anderen deutschen Standorten fand die Beprobung jedes Jahr auf mehreren kleinen Feldern von ca. 0,5 ha - 10 ha statt. Die Larven von den einzelnen Feldern wurden anschließend zusammengeführt und aus dieser Grundgesamtheit sind 20 Larven von *O. nubilalis* für die populationsgenetischen Untersuchungen herangezogen worden. Auf den ausgewählten Feldern wurde überwiegend Silo- und Körnermais angebaut. Nur im Oderbruch des Jahres 2001 wurde auf dem von uns beprobten Feld der Mais als Corn-Cob-Mix (CCM) geerntet.

Die Sammeltermine erfolgten bei den Standorten Oderbruch, Halle, Hessisches Ried, Pocking, Bonn, Niedernberg und den beiden ausländischen Standorten in den Monaten September und Oktober überwiegend in den Stoppeln. Bei den Standorten Bodensee, Karlsruhe und Freiburg sind während der Sommermonate Juni und Juli im Maisbestand Falter von *O. nubilalis* gefangen und im Labor vermehrt worden. Die Folgegenerationen (Larven), der im Feld gesammelten Falter, wurden für die DNA-Extraktion verwendet. In den südlichen Standorten Deutschlands wurde ein geringer bis mittlerer *O. nubilalis*-Befall beobachtet, in den nordöstlichen Standorten hingegen ein mittlerer bis starker Befall registriert.

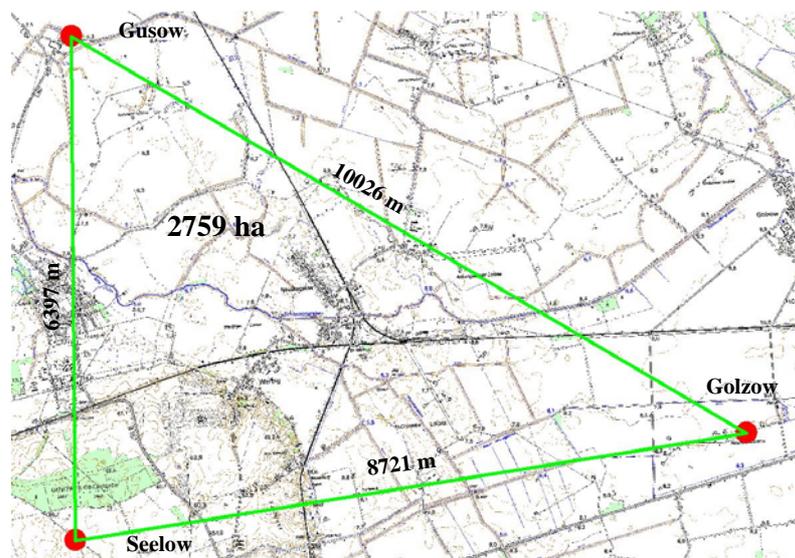


Abb. 10: Lage und mit GPS ermittelte Entfernung der Sammelstellen am Standort Oderbruch in den Jahren 1999 (Golzow), 2000 (Seelow) und 2001 (Gusow)

Angaben zur detaillierten Lage der Flächen, zur Feldgröße (bis auf die süddeutschen Standorte), zur Art des Maisanbaues, sowie zu den verschiedenen Sammelmethoden sind im Anhang 1 aufgeführt.

Als Ausgangsmaterial für die populationsgenetischen Untersuchungen wurden die Larven von *O. nubilalis* im letzten Larvenstadium (L5) ausgewählt. Für die überwiegend nördlich gelegenen Gebiete (Oderbruch, Halle, Niedernberg, Hessisches Ried, Bonn, Pocking) wurde jeweils im Herbst der Jahre 1999, 2000 und 2001 ein umfangreiches Probenmaterial mit einer Anzahl von jeweils ca. 200 – 1400 Larven von *O. nubilalis* pro Population in den Maisfeldern gesammelt. Die BBA in Darmstadt sammelte *O. nubilalis*-Larven von den Standorten Niedernberg, Hessisches Ried und Pocking. Für spezielle molekularbiologische Untersuchungen stellte sie weiterhin die E-Rasse (in Beifuß *Artemisia vulgaris* gesammelt) aus den Gebieten Lintel, Göttingen, Bonn, Hessisches Ried und Halle zur Verfügung.

Die Probenentnahme erfolgte durch das Aufschneiden der unteren Pflanzenstängel, in denen Bohrlöcher und Fraßmehl sichtbar waren. Ein Großteil der Larven wurde für die Zucht und die späteren Biotests eingesetzt. Der Rest bestehend aus min. 20 Larven pro Population wurde bei -70 °C für die genetischen Tests eingefroren. Auch bei den beiden Lokalpopulationen aus Polen und Frankreich wurden im Herbst L5-Larven auf den Feldern gesammelt.

Larven von *O. nubilalis* aus den alten südwestdeutschen Gebieten (Karlsruhe, Freiburg, Bodensee) und aus der Lokalpopulation Bonn stellte die Universität Aachen zur Verfügung. Im Sommer wurden diese als Falter mittels Lichtfallen gefangen oder als Eier von den Maisblättern abgesammelt. Nach Etablierung der verschiedenen Lokalpopulationen im ersten Jahr, erfolgte in den beiden folgenden Jahren eine Auffrischung der bestehenden Zucht durch neue Tiere aus dem Freiland. Da jedoch erst die nachfolgende Generation in die RAPD-PCR einging, handelte es sich bei den Larven von *O. nubilalis* aus dem südlichen Teil Deutschlands ausschließlich um Labortiere. Bei der Lokalpopulation Bonn hingegen sind die Maiszünsler als L5-Larven im Feld gesammelt worden. Bei den *O. nubilalis*-Larven aus den Laborzuchten handelte es sich um unterschiedliche Folgegenerationen des Vorjahrs, die ebenfalls das L5-Stadium erreicht hatten.

Von insgesamt fünf deutschen Standorten (Oderbruch, Halle, Niedernberg, Hessisches Ried, Pocking) standen *O. nubilalis*-Larven in drei aufeinanderfolgenden Jahren von 1999

– 2002 für die genetischen Tests zur Verfügung. Bei den Standorten Bonn (Jahr: 1999, 2001) und Karlsruhe (Jahr: 1999, 2000) wurden jeweils nur zwei Jahre beprobt. Bei den restlichen beiden Standorten Freiburg (2001) und Bodensee (2000) sind die Lokalpopulationen nur von einem Jahr für genetische Tests herangezogen worden. Für die Lokalpopulationen aus den französischen und polnischen Gebieten sind die *O. nubilalis*-Larven aus dem Jahr 2002 für die populationsgenetischen Tests eingesetzt worden.

2.3 Extraktion, fluorometrische Messung und Elektrophorese der DNA

2.3.1 Präparation der Larven und Extraktion von DNA

Alle Chemikalien, Puffer, Lösungen und Geräte, die bei der Extraktion, bei den PCR-Methoden einschließlich Elektrophorese, TGGE, ITS, T-RFLP und Sequenzierung verwendet wurden, sind im Anhang 2 und 3 aufgelistet. Grundlage der DNA-Extraktion war das Protokoll nach DELLAPORTA et al. (1983), welches für die *O. nubilalis*-Extraktion modifiziert wurde. Als Referenzproben wurden Mais-DNA und Kalbs-Thymus-DNA eingesetzt. Die Extraktion wurde bei allen 20er-Gruppen (Mischung aus 20 Larven) durchgeführt, die in die populationsgenetischen Untersuchungen für die Untersuchungsjahre eingingen.

Weiterhin sind auch für gesonderte Fragestellungen Einzeltiere und bestimmte Körperabschnitte einzelner Individuen und Fäzes-Proben nach dem gleichen Verfahren extrahiert worden. Bei den Körperabschnitten handelte es sich um das Kopfsegment, die drei Thorax- und Abdomensegmente eines Individuums, sowie um einzelne Darmproben von anderen *O. nubilalis*-Larven. Es ist anzumerken, dass die in der Extraktionsbeschreibung aufgeführten Gewebemengen von 25 mg – 35 mg bei diesen Extraktionen unterschritten wurden. Dies hatte jedoch keine Konsequenzen auf das RAPD-Muster, da eigene Untersuchungen einen weiten Toleranzbereich der Template-Konzentration zeigten. Bei der DNA-Isolierung von Einzeltieren hingegen wurden die Gewebemengen eingehalten, teilweise auch durch Einsatz des gesamten Tieres. Die einzelnen Extraktionsschritte werden in dem folgenden Abschnitt beschrieben:

1. Gewinnung des mittleren Larventeils mit einer Größe von ca. 25 mg – 35 mg mit Hilfe eines Skalpells von den bei – 70°C gelagerten Larven; Aufbewahrung dieser Larvenstücke bei – 20°C bis zur weiteren Verarbeitung; bei Tiergruppen-Extraktionen Sammlung der Larvenstücke einer Populationsprobe in einem Reaktionsgefäß;

2. Überführung der Larventeile in einen Mörser; Zerkleinerung des mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Larvengewebes mit Quarzsand (30 mg/Larve) durch ein Pistill zu feinem Pulver; Überführung der Pulver-Probe mit einem vorher gekühlten Spatel in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, Lagerung der Proben auf Eis;
3. Zugabe von 750 µl Extraktionspuffer und gutes Durchmischen der Lösung mittels Vortex; Zugabe von 50 µl 20 % SDS; vorsichtiges Schütteln (ca. 25 x) und anschließend 10 min. Inkubierung im Wasserbad bei 65 °C;
4. Zugabe von 250 µl 5 M KAc-Lösung (4 °C); erneute Mischung der Lösung durch Schütteln der Reaktionsgefäße; Überführung der Proben für 20 min auf Eis, dabei bildet sich ein weißer Niederschlag von Kalium-dodecylsulfat;
5. 20 min Zentrifugation bei 14 000 g und 4 °C; Abnahme des klaren Überstands mit der enthaltenen DNA und Überführung in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß; erneute Zentrifugation und Abnahme des Überstandes;
6. Erste DNA-Fällung bei -20 °C mit 500 µl Isopropanol (-20 °C) für 30 min;
7. Zentrifugation bei 14 000 g und 4 °C für 20 min; Verwerfung des Überstandes und anschließende Trocknung des DNA-Pellets in der Vakuumzentrifuge für fünf bis acht Minuten; Lösung des DNA-Pellets in 100 µl TE-Puffer;
8. Zweite DNA-Fällung durch Zugabe von 10 µl 3 M NaAc (4 °C) und 250 µl reines, gekühltes Ethanol; Lagerung der Proben über Nacht bei -20 °C oder für mind. 2 h bei -70 °C;
9. Sedimentation der ausgefällten DNA durch Zentrifugation bei 14 000 g und 4 °C für 30 min; Verwerfung des Überstandes und Waschen des DNA-Pellets mit 70 %igem Ethanol; Entfernung des restlichen Ethanols vom DNA-Pellet nach 5 min Zentrifugation;
10. Lösen der DNA in 100 µl 1x TE-Puffer und Aufbewahrung der gelösten DNA bei -20 °C;
11. DNA-Messung mittels Fluorimeter und Einstellung der DNA-Menge auf 1 ng/µl für die anschließende PCR.

2.3.2 Fluorometrische DNA-Messung

Die Bestimmung der DNA-Quantität erfolgte durch eine Fluoreszenzmessung und/oder Auftragung der extrahierten DNA mittels Agarosegelelektrophorese. Im letzten Falle wird außerdem die Qualität der DNA auf dem Gel sichtbar, da hochmolekulare von gescherter oder niedermolekularer DNA visuell unterschieden werden kann. Für die

Konzentrationsbestimmungen der DNA wurde das Fluorimeter DyNA Quant 200 (Hoefer) benutzt. Das Gerät wurde zunächst mit Kalbsthymus-DNA kalibriert. Der Nullabgleich erfolgte mit der Farbstofflösung Hoechst 33258 in 1x TNE-Puffer. Der Vorteil dieser Methode gegenüber einer photometrischen Messung liegt in der Nichtbeeinflussung der Messergebnisse durch mitextrahierte RNA, da der DNA-interkalierende Farbstoff Hoe 33258 nicht an RNA-Einzelstränge bindet.

Für eine semi-quantitative Abschätzung der DNA-Menge erfolgte die Auftragung der Template-DNA zusammen mit verschiedenen bekannten Mengen der Thymus-DNA auf einem 1 %igen Agarosegel. Nach einer dreistündigen Elektrophorese in 1x TAE-Puffer wurde die DNA mit Ethidiumbromid gefärbt. Durch den Vergleich mit unterschiedlichen Konzentrationen der Thymus-DNA kann neben der DNA-Qualität (Scherung der DNA) auch eine Abschätzung über die Quantität der untersuchten DNA getroffen werden. Dies erfolgt mit Hilfe des Programms ScanPackTM 3.0 (1997).

2.3.3 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen

Für die Auftrennung der genomischen DNA wie auch der PCR-Produkte wurde eine horizontale Elektrophorese in Agarosegelen verwendet. Dazu ist jeweils ein 2 %iges Gel mit 1X TAE-Puffer hergestellt worden, um einen Größenbereich von 100 bp – 2000 bp (MANIATIS et al., 1989) auswerten zu können. Die Agaroselösung wurde bei einer Temperatur von 60 °C bis 65 °C in ein mit Tesafilm umklebtes Geltablett (19,5 cm x 15 cm) blasenfrei eingegossen. Es wurden zwei Gele mit jeweils 36 Slots (Vorgel) und 20 Slots (Hauptgel) hergestellt. Die Gelkammer (Pharmacia Biotech) wurde mit 1x TAE-Puffer so befüllt, dass die Geloberfläche mit ca. 3 mm - 5 mm Puffer überschichtet war. Um eine Erwärmung des Gels vorzubeugen, wurde der TAE-Puffer bei einer Temperatur von 14 °C gekühlt. Dieser Kühlungseffekt wurde durch eine gleichmäßige Zirkulation des Puffers mittels eines Magnetrührers verstärkt.

Die mit 6x Gelladungspuffer im Verhältnis 1:5 versetzten PCR-Proben wurden anschließend in die Geltaschen übertragen. Für die Bestimmung der Bandengröße und einer guten Auswertung der Bandenproben sind die äußeren Seiten des Gels mit dem 100 bp-Marker Gibco (3 µl) beladen worden, der eine Auftrennung in 100 bp-Schritten aufzeigte (fette Banden bei 600 bp, 1500 bp und 2072 bp; siehe Anhang 7). Das Gel wurde drei Stunden einer Spannung von 150 V ausgesetzt. Der im Gelladungspuffer enthaltene

Farbstoff Bromphenolblau markierte den 300 bp-Bereich, der nach drei Stunden ca. 1 cm vom Gelende an der Anodenseite entfernt war.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel in 500 ml Färbelösung mit 4 µg/ml Ethidiumbromid für 30 min auf einer Wippe bewegt. Anschließend wurde das Gel für 30 min in einer 1 mM Magnesiumsulfat-Lösung entfärbt. Damit wurde überschüssiges Ethidiumbromid, welches unspezifisch den Hintergrund anfärbt, entfernt. Mit dem Biodoc Analysesystem (Biometra) wurden die bei 312 nm illuminierten Gele aufgenommen und die Bilder zur weiteren Bearbeitung digitalisiert.

2.4 PCR-Techniken

2.4.1 Reaktionsbedingungen der RAPD-PCR

Um eine Kontamination durch Aerosole während der Pipettierung zu verhindern, wurden für alle PCR-Ansätze Sterilfilter-Spitzen verwendet. Die PCR-Arbeiten begannen mit einer halbstündigen UV-Bestrahlung aller Reaktionsgefäße, um Verunreinigungen zu minimieren. Für die Durchführung der RAPD-PCR mussten die einzelnen Reaktionskomponenten optimiert werden, um konstante Amplifikationsprodukte und somit reproduzierbare RAPD-Ergebnisse zu gewährleisten. Alle Optimierungen sind mit Larven von *O. nubilalis* aus dem Oderbruch durchgeführt worden. Erschwert wird die Optimierung durch die gegenseitige Beeinflussung mehrerer Reaktionskomponenten. Nur wenn alle Komponenten optimal aufeinander abgestimmt sind, wird die Reproduzierbarkeit gewährleistet (WINK & WEHRLE, 1994). Der Einstieg in die RAPD-PCR berücksichtigte die Erfahrungen, die in der BBA vorliegen (PASTRIK et al., 1995). Für die populationsgenetischen Arbeiten an *O. nubilalis* wurden folgende Versuchsparameter variiert:

- a) Mg-Konzentration (2,5 mM - 5 mM);
- b) Polymerase-Typ (AmpliTaq, Stoffelfragment) und Polymerase-Konzentration (2 U – 6 U; mit und ohne Q-Solution* von Qiagen);
(*Q-Solution ist ein kommerzielles Reagenz von Qiagen für die PCR; es modifiziert das Schmelzverhalten für GC-reiche Template-DNA);
- c) dNTP-Konzentration (100 µM – 300 µM);
- d) Primer-Konzentration (0,1 µM – 0,4 µM), Auswahl aus 30 Primern;
- e) Menge genomischer DNA (0,2 pg – 50 ng);
- f) Thermocycler-Programm (verschiedene Annealingtemperaturen);

- g) Touch-Down-PCR (Erniedrigung der Annealingtemperatur während des PCR-Laufs);
- h) Testung auf Störungen der RAPD-PCR durch RNA im DNA-Extrakt.

Die Ergebnisse aus den einzelnen Optimierungen wurden zusammengefasst und daraus die Reaktionsbedingungen für alle auszuführenden RAPD-PCR festgelegt. Die Amplifizierung wurde in einem Reaktionsvolumen von 25 µl mit folgenden Reagenzien durchgeführt (Tab. 4):

Tab. 4: Optimierte Reaktionsbedingungen der RAPD-PCR

Reagenz	Stammlösung	Finale Konzentration
Polymerasepuffer	10 x	1 x
MgCl ₂	25 mM	4 mM
dNTPs	10 mM	200 µM
Primer	10 µM	0,2 µM
Taq-Polymerase	10 U	5 U
H ₂ O	-	auf 23 µl auffüllen
DNA-Probe	1 ng/µl	2 ng

Bei dem Wasser handelte es sich um DNA- und RNA-freies, doppelt destilliertes Wasser der Firma Fluka. Die fertigen Proben wurden gemischt, kurz zentrifugiert und in den Thermocycler überführt.

Bei den RAPD-Versuchen wurden letztendlich 20 von insgesamt 30 getesteten Primern für alle populationsgenetischen Untersuchungen eingesetzt. Dabei handelt es sich sowohl um polymorphe Primer (hohe Variation der RAPD-Muster zwischen den verschiedenen Standorten) als auch um monomorphe Primer. Die Tabelle 5 zeigt eine Übersicht der verwendeten Primer mit deren Nukleotidsequenz, G/C-Gehalt und T_m-Wert (Schmelztemperatur). Die Sequenzen der ersten acht Primer wurden von Operon Technologies INC, die restlichen Primer von der Carl Roth GmbH in entsprechenden Kits angeboten. Die Synthese der ersten zehn Primer erfolgte von MWG-Biotech AG, die letzten zehn Primer von der Carl Roth GmbH.

Tab. 5: Sequenz, G/C-Gehalt und Schmelztemperatur der 30 getesteten RAPD-Primer

Nr.	Primer	Sequenz (5'-3')	G/C-Gehalt [%]	Tm [°C]
1	OPA-05	AGG GGT CTT G	60	32
2	OPA-07	GAA ACG GGT G	60	32
3	OPB-01	GTT TCG CTC C	60	32
4	OPB-08	GTC CAC ACG G	70	34
5	OPC-15	GAC GGA TCA G	60	32
6	OPC-18	TGA GTG GGT G	60	32
7	OPD-11	AGC GCC ATT G	60	32
8	OPF-03	CCT GAT CAC C	60	32
9	Roth180-08	CGC CCT CAG C	80	36
10	Roth280-08	GGC CAC AGC G	80	36
11	Roth-A 02	TGC CGA GCT G	70	34
12	Roth-A 03	AGT CAG CCA C	60	32
13	Roth-A 09	GGG TAA CGC C	70	34
14	Roth-A 10	GTG ATC GCA G	60	32
15	Roth-A 11	CAA TCG CCG T	60	32
16	Roth-A 12	TCG GCG ATA G	60	32
17	Roth-A 16	AGC CAG CGA A	60	32
18	Roth-A 18	AGG TGA CCG T	60	32
19	Roth-A 19	CAA ACG TCG G	60	32
20	Roth-A 20	GTT GCG ATC C	60	32
21	Roth-A 01	CAG GCC CTT C	70	34
22	Roth-A 04	AAT CGG GCT G	60	32
23	Roth-A 05	AGG GGT CTT G	60	32
24	Roth-A 06	GGT CCC TGA C	70	34
25	Roth-A 08	GTG ACG TAG G	70	32
26	Roth-A 13	CAG CAC CCA C	70	34
27	Roth-A 14	TCT GTG CTG G	60	32
28	Roth-A 15	TTC CGA ACC C	60	32
29	Roth-A 17	GAC CGC TTG T	60	32
30	OPF-01	ACG GAT CCT G	60	32

Der T_m-Wert gibt an, bei welcher Temperatur 50 % der Oligonucleotide gebunden werden. Die optimale Annealingtemperatur liegt ca. 5 °C unter dem errechneten T_m-Wert. Es wird jedoch eine Annealingtemperatur oberhalb der T_m eingesetzt, da bei höheren Temperaturen die Bildung unspezifischer Fragmente verringert wird. Die Schmelztemperatur wird wie folgt berechnet: $T_m = 4x (G + C) + 2x (A + T)$ (MÜLLER, 2001b). Bei allen RAPD-Primern wurde eine Annealingtemperatur von 38 °C in der RAPD-PCR eingestellt.

Sämtliche PCR-Versuche wurden mit dem Thermocycler PTC-200 von Biozym durchgeführt, der eine Aufheizrate von 3 °C/s und eine Blockhomogenität von ± 0,3 °C/s besitzt. Um Kondensationseffekte während der PCR zu verhindern, wurde eine konstante Deckeltemperatur von 105 °C eingestellt, die das aufwendige Überschichten der Proben mit Mineralöl ersetzte.

Das Temperatur/Zeit-Profil wurde von SCHRADER (1996) übernommen und anhand der Literaturquelle von PORNKULWAT et al. (1998) verändert. Um die Hybridisierungsrate aller Primer mit unterschiedlichen T_m-Werten abzudecken, ist die Aufheizrate (Ramp) beim Übergang vom Annealing- zum Amplifikationsschritt auf 0,3 °C/s reduziert worden. Das in der Arbeit verwendete Thermocycler-Programm ist in Tabelle 6 aufgeführt.

Tab. 6: Thermocycler-Programm für die RAPD-PCR auf einem PTC 200 (Heizdeckeltemperatur: 105 °C)

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Ramp [°C/s]
Initial-Denaturierung	94	2:30	
10 Zyklen			
Denaturierung	92	1:00	
Annealing	38	0:30	0,3
DNA-Amplifikation	72	1:00	
30 Zyklen			
Denaturierung	92	0:20	
Annealing	38	0:15	0,3
DNA-Amplifikation	72	1:00	
Abschluss			
Final-Extension	72	8:00	
Kühlung	4	∞	

Alle DNA-Proben eines Jahres wurden pro Reaktionsansatz mit jeweils einem Primer bearbeitet. Dabei wurden für jede DNA-Probe zwei Wiederholungen angesetzt. Proben mit variierenden RAPD-Mustern (z. B. geringer Bandenintensität) sind nicht in die Auswertung eingegangen.

Nach der PCR wurden die Reaktionsansätze von 25 µl mit 5 µl 6x Gelladungspuffer (1:1, v/v) vermischt und jeweils 5 µl auf einem Vor- oder Übersichtsgel (36er Kamm) aufgetragen. Damit konnte die Reproduzierbarkeit der einzelnen DNA-Proben innerhalb eines Standorts überprüft werden. Die Probe mit den kräftigsten Banden wurde anschließend mit einem Volumen von 10 µl auf ein 2%iges Gel aufgetragen, welches doppelt so große Geltaschen gegenüber dem Vorgel besaß. Dies führte zu einer besseren Qualität der DNA-Banden. Wenn eine DNA-Probe in beiden Reaktionsansätzen misslang, wurde die gesamte PCR wiederholt. Somit konnten über alle DNA-Proben konstante Reaktionsbedingungen pro Primer gewährleistet werden.

2.4.2 Aufnahme und statistische Auswertung der RAPD-Muster

2.4.2.1 Erstellung eines Dendrogramms

Um Genotypen mittels molekulargenetischer Marker, wie z. B. bei der RAPD-PCR, nach ihren genetischen Distanzen zu gliedern, werden Clusteranalysen durchgeführt. Unter einer Clusteranalyse versteht man ein Verfahren zur Klassifikation von Objekten. Die durch mehrere Merkmale beschriebenen Objekte werden nach ihrer Ähnlichkeit in homogene Gruppen, den sog. Clustern, eingeteilt. Ziel der Gruppierung ist es, dass Objekte, die derselben Gruppe zugewiesen werden, sich möglichst wenig, Objekte aus verschiedenen Gruppen hingegen sich stärker voneinander unterscheiden. Das Clusteranalyseverfahren wird dort eingesetzt, wo Objekte durch viele Einzelmerkmale beschrieben und/oder eine Reihe von Objekten untersucht werden, die mit einfachen Mitteln nicht mehr zu überblicken sind (STEINHAUSEN & LANGER, 1977; DEICHSEL & TRAMPISCH, 1985). Die Darstellung der Clusteranalyse im Dendrogramm hat die Funktion einer Datenstrukturierung, nicht jedoch die der Schätzung spezieller Parameter einer Population (STEINHAUSEN & LANGER, 1977).

In dieser Arbeit wurden alle Clusteranalysen auf der Grundlage einer 0/1-Matrix mit dem Programm MVSP Version 3.1 (KOVACH, 1999) berechnet. Die Ähnlichkeiten zwischen den Lokalpopulationen werden durch einen Ähnlichkeitskoeffizienten (*similarity coefficient*) bzw. ein Distanzmaß (*dissimilarity coefficient*) erfasst. Die Auswertung

basierte auf der Berechnungsgrundlage des im Programm MVSP angegebenen Ähnlichkeitskoeffizienten nach NEI & LI (1979).

$$NLc_{ij} = \frac{2n_{xy}}{(n_{x,y} + n_x) + (n_{x,y} + n_y)}$$

c_{ij} gibt die Ähnlichkeit bzw. Distanz des i-ten Elements mit dem j-ten Element wieder; i und j stellen hier verschiedene *O. nubilalis*-Standorte dar.

$n_{x,y}$ Anzahl gemeinsamer Merkmale der Organismen x und y,

n_x Anzahl der Merkmale in x,

n_y Anzahl der Merkmale in y.

Zur Ermittlung des Ähnlichkeitskoeffizienten wurde für jeden RAPD-Primer bei jeder untersuchten Population das Vorhandensein bestimmter Banden tabellarisch nach dem binären System (1 oder 0, d. h. Bande vorhanden bzw. nicht vorhanden) dargestellt. Der Ähnlichkeitskoeffizient und das Distanzmaß werden oft wechselweise verwendet. Ihr Zusammenhang ist:

$$\text{Distanzmaß} = 1 - \text{Ähnlichkeitskoeffizient (NL)}$$

Daher können auch alle paarweisen Distanzen zwischen Genotypen aufgrund des Distanzmaßes (unterschiedlich je nach Markertyp, z. B. „Nei & Li“ nach NEI (1972) ermittelt werden. In allen in dieser Arbeit dargestellten Clustern ist auf der x-Achse der Ähnlichkeitskoeffizient dargestellt. Von der Vielzahl der bestehenden Clustermethoden wurde der UPGMA-Algorithmus (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*) für die RAPD-Auswertungen herangezogen (SOKAL & MICHENER, 1958; SNEATH & SOKAL, 1973). Die Entscheidung mit dieser Cluster-Methode zu arbeiten, ergab sich durch die allgemein anerkannte Verwendung in vergleichbaren Literaturarbeiten. Bei dieser Methode wird zunächst das Objektpaar mit dem niedrigsten Ähnlichkeitskoeffizienten zu einem Cluster zusammengeführt und dieser fungiert bei der weiteren Berechnung als Einzelwert. Um die Ähnlichkeitskoeffizienten zweier Cluster zu errechnen, wird der Mittelwert der Ähnlichkeitskoeffizienten ihrer Variablen zueinander verwendet. Die errechneten Werte sind jedoch keine Maßzahlen für Verwandtschaften.

2.4.2.2 Validierung der Dendrogramme

Um die Aussagen der erstellten Dendrogramme zu bestätigen bzw. auf Zuverlässigkeit zu überprüfen, wurden verschiedene Validierungen vorgenommen. Die einfachste Validierung ist durch eine randomisierte Eingabe im Programm MVSP durchgeführt worden, die mit der gleichen vorhandenen Datengrundlage beliebig oft wiederholt werden kann. Zusätzlich wurden weitere anerkannte Validierungsverfahren, wie der Bootstraptest und der Permutationstest, herangezogen.

Zur Überprüfung der Daten, die in den Clustern verarbeitet wurden und die richtige Gruppierung repräsentieren, wird ein Wahrscheinlichkeitswert ermittelt, welcher die genetische Ähnlichkeit der verschiedenen Standorte mit den wahren Verhältnissen abschätzt (HILLS & BULL, 1993). FELSENSTEIN (1985) schlägt vor, den statistischen **Bootstraptest** von EFRON (1979, 1982, 1987) zur Überprüfung der Konfidenzgrenzen von inneren Zweigen in phylogenetischen Analysen zu verwenden. Bei diesem Verfahren wird die Datenmatrix zufällig modifiziert. Es werden unabhängige Stichproben (Pseudomatrizen) aus den vorhandenen Daten einer Matrix gewonnen, indem zufällige Positionen gezogen und zurückgelegt werden. Dieser Prozess der Erstellung von Pseudostichproben wird 100 – 1000-mal wiederholt. Nun kann die Häufigkeit des ursprünglich erstellten Baumes gemessen und dessen Relevanz abgeschätzt werden. In dieser Arbeit wurde für alle Clusteranalysen das Bootstrap-Verfahren mit Hilfe des Softwareprogramms SIMSTAT v. 2.07 für Windows (Copyright 1996, Provalis Reseach) angewandt, da nur dieses mit dem Programm MVSP harmoniert. Der Bootstraptest ist mit 100 Pseudostichproben durchgeführt worden. Anschließend wurde per Hand die Häufigkeit der Zuordnung von zwei und mehreren Standorten analysiert und diese Prozentwerte auf die Äste des Clusters übertragen. Ein vertrauenswürdiger realistischer Wert liegt zwischen 60 % – 80 %. Alle Werte, die sich darüber befinden, sind sehr gut abgesichert, für alle Werte darunter ist die Datenmenge nicht angepasst.

Da reale Datensätze, die mehrere Wiederholungen enthalten, eine bessere Bewertung der Validierung ermöglichen als künstlich erzeugte Datensätze, wie z. B. beim Bootstraptest, wurde für einen gesonderten Versuch der **Permutationstest** in Zusammenarbeit mit der Universität Magdeburg durchgeführt. Dieser Test basierte auf drei Jahreswiederholungen von den drei ausgewählten Standorten Oderbruch, Hessisches Ried und Pocking mit den drei Primern OPB-01, OPC-15 und OPF-03. Die mit Hilfe von MVSP ermittelten Ähnlichkeitskoeffizienten wurden auf der Grundlage einer gemeinsamen RAPD-PCR und

einer simultanen Gelauftragung ermittelt. Anschließend wurden diese Ähnlichkeitskoeffizienten in ein an der Universität Magdeburg entwickeltes Programm (pers. Mitt. KROPF, 2003) für den Permutationstest eingesetzt und daraus der P-Wert ermittelt.

2.4.2.3 Manteltest und F-Statistik

Mittels der Software XLSTAT 7.0 wurde für die Korrelation zwischen der genetischen Ähnlichkeit (Matrix Y) einerseits und der geographischen Distanz, den geographischen Höhendifferenzen sowie den Niederschlags- und Temperaturdifferenzen (Matrix X) andererseits der Manteltest (MANTEL, 1967) durchgeführt. Ist der Signifikanzwert P größer als α (0,05), dann wird die Null-Hypothese angenommen, wonach die Objekte der Matrix Y nicht korreliert sind mit den Abständen in Matrix X.

Bei der Auswertung zur Auswahl der Template-DNA (Probenentnahme), dem Vergleich zwischen den Geschwistern und dem Vergleich innerhalb und zwischen den Lokalpopulationen anhand von Einzeltier- und Tiergruppen-DNA-Extrakten ist der Anteil der gemeinsamen RAPD-Banden bestimmt worden. Dieser Wert wird analog zur Arbeit von CHAPCO et al. (1992) als **F-Wert** benannt. Der F-Wert pro Variante wurde über alle Banden der verwendeten Primer gemittelt und zusammen mit der Standardabweichung angegeben. Der F-Wert kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei mit steigendem F-Wert immer mehr Banden zwischen den Proben übereinstimmen. Neben dem Anteil gemeinsamer RAPD-Banden (F-Wert = p) kann auch die Heterozygotität für die Bewertung der Populationsstrukturen herangezogen werden. Bei ihr gehen jedoch im Vergleich zu den F-Werten keine monomorphen Banden in die Auswertung ein. Innerhalb einer Art mit einer hierarchischen Populationsstruktur kann die Heterozygotität auf verschiedenen Ebenen berechnet werden:

- H_S = durchschnittliche Heterozygotität aller Organismen in einer zufällig paarenden Subpopulation bzw. Lokalpopulation; Formel nach HARTL & CLARK (1997); p_{ij} = Anteil gemeinsamer RAPD-Banden

$$H_S = \sum_i \sum_j 2p_{ij}(1 - p_{ij})$$

- H_T = durchschnittliche Heterozygotität aller Individuen/Populationen der gesamten Art; Formel nach HARTL & CLARK (1997), p_{ij} = Anteil gemeinsamer RAPD-Banden

$$H_T = \sum_i 2 \frac{\sum_j p_{ij}}{n_i} \left[1 - \frac{\sum_j p_{ij}}{n_i} \right]$$

Aus diesen Heterozygotitäts-Werten wird der in Anlehnung an WRIGHT (1943) eingeführte **Fixierungsindex** F_{ST} nach der Formel $F_{ST} = (\mathbf{H}_T - \mathbf{H}_S)/\mathbf{H}_T$ ermittelt. Der F_{ST} -Wert quantifiziert die Zunahme der Homozygotität bzw. Abnahme der Heterozygotität aller Subpopulationen (Lokalpopulationen) bezogen auf die gesamte Art. F_{ST} kann ebenfalls Werte zwischen 0 und 1 annehmen, wobei für $F_{ST} = 0$ keine Populationsstruktur existiert und sich damit alle Subpopulationen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (HWG) befinden, d. h. panmiktisch (Population mit Zufallspaarung) sind und $F_{ST} = 1$ eine sehr starke Populationsstruktur aufweist. Für die berechneten F_{ST} -Werte schlug WRIGHT (1978) folgende Interpretation vor:

- 0 – 0,05 geringe genetische Differenzierung;
- 0,05 – 0,15 mittlere genetische Differenzierung;
- 0,15 – 0,25 große genetische Differenzierung;
- > 0,25 sehr große genetische Differenzierung.

Aus den F_{ST} -Werten kann pro Generation ein **Relativwert für migrierende Individuen** (**Nm**) durch die Formel $\mathbf{Nm} = 1/4 (1/F_{ST} - 1)$ abgeschätzt werden. Dabei bedeutet $Nm = 0,25$ – ein Migrant in jeder 4. Generation, $Nm = 0,5$ – ein Migrant in jeder 2. Generation, $Nm = 1$ – ein Migrant in jeder Generation, $Nm = 2$ – zwei Migranten in jeder Generation und $Nm = 4$ – vier Migranten in jeder Generation (panmiktische Population). Bei der Schätzung dieses Nm-Wertes muss beachtet werden, dass dabei von einem theoretischen Drift-Genfluss-Gleichgewicht ausgegangen wird (WRIGHT, 1978). Dieses liegt aber in vielen natürlichen Populationen nicht vor.

2.4.3 Reaktionsbedingungen der spezifischen PCR

Während die RAPD-PCR genomische DNA berücksichtigt, erfassen andere Analysen spezifische Sequenzen. Hierzu gehören die 16S rDNA von Bakterien mittels T-RFLP, der ITS-1-Bereich von *O. nubilalis* und das *high mobility group protein* des Mais.

2.4.3.1 Mais-DNA in der Template-DNA von *O. nubilalis*

Ein wichtiger Aspekt war die Prüfung, ob in den verschiedenen DNA-Extrakten von *O. nubilalis* Mais-DNA nachweisbar ist. Für diese PCR-Reaktionen wurden die in Tab. 7 beschriebenen maisspezifischen Primer hm3 und hm4 (MWG Biotech-AG) verwendet, die das *high mobility* Gruppen-Protein des Mais nachweisen (ZIMMERMANN et al., 1998). Die Reaktionsbedingungen der PCR sind in der Tabelle 8 aufgeführt.

Tab. 7: Sequenz, G/C-Gehalt und Schmelztemperatur der für Mais spezifischen Primer

Primer	Sequenz (5'-3')	G/C-Gehalt [%]	Tm [°C]
hm3	GAA ATC CCT GAG CGA GTC GGT A	54,5	68
hm4	GCG ATG GCC TTG TTG TAC TCG A	54,5	68

Tab. 8: PCR-Ansatz zum spezifischen Nachweis von Mais-DNA innerhalb der genomischen Template-DNA von *O. nubilalis*

Reagenz	Stammlösung	Finale Konzentration
Stoffelpuffer	10 x	1 x
Mg Cl ₂	15 mM	1,5 mM
dNTPs	10 mM	200 µM
Primer hm3	100 µM	0,5 µM
Primer hm4	100 µM	0,5 µM
Taq-Polymerase	5 U	1 U
DNA-Probe	1 ng/µl	2 ng

Die Thermocycler-Bedingungen, die von ZIMMERMANN et al. (1998) übernommen wurden sind nach folgendem Schema eingestellt worden:

Tab. 9: Thermocycler-Programm der spezifischen PCR zum Nachweis von Mais-DNA auf einem PTC 200 (Heizdeckeltemperatur: 105 °C)

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Initial-Denaturierung	95	4:30
40 Zyklen		
Denaturierung	95	1:30
Annealing	60	1:50
DNA-Amplifikation	72	1:50
Abschluss		
Final-Denaturierung	72	4:15
Kühlung	4	∞

Der Nachweis der Mais-DNA erfolgte mit L5-Larven vom Feld und mit L1 und L5-Larven aus der Zucht. Als positive Referenzprobe wurde aus Maisblättern extrahierte DNA für die spezifische PCR eingesetzt. Die Auswertung der maisspezifischen PCR erfolgt visuell auf einem 2 %igen Agarosegel mit einer Markerspür und einer positiven Mais-Kontrolle als Vergleichsbasis. Wenn eine Bande bei 175 bp sichtbar wurde, dann ist davon auszugehen, dass Mais-DNA in der PCR-Probe vorhanden war.

2.4.3.2 ITS-1-Fragmente von *O. nubilalis*

Innerhalb der ribosomalen DNA (rDNA) sollte der ITS-1 (Interner Transkribierender Spacer) Bereich von *O. nubilalis* untersucht werden. Dieser Spacer trennt die Gene für die 18S und 5,8S rRNA, die als tandemartig wiederholte Gengruppen in der rDNA zu finden sind. Nach der Amplifikation des ITS-1 Bereiches können mit Hilfe von Restriktionsenzymen, der TGGE und der Sequenzierung Unterschiede innerhalb dieser Sequenz aufgedeckt werden. Mit den Primern ITS-f und ITS-r (Tab. 10) nach MARCON et al. (1999) wurde von verschiedenen lokalen *O. nubilalis*-Populationen und Rassen der ITS-1-Bereich amplifiziert (Abb. 11).

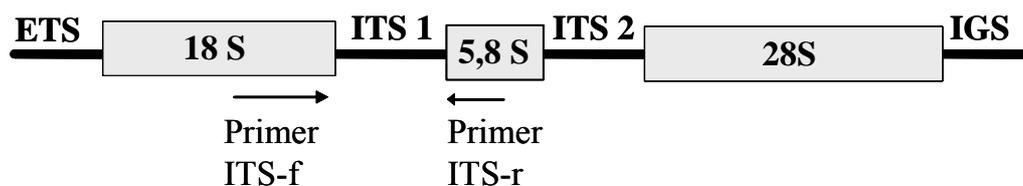


Abb. 11: Schematische Darstellung der ITS-Bereiche (**ETS** = external transcribed spacer, **ITS** = internal transcribed spacer, **IGS** = inter genetic spacer, **f** = forward, **r** = reverse)

Tab. 10: Sequenz, G/C-Gehalt und Schmelztemperatur der spezifischen Primer für die Amplifizierung des ITS-1-Fragmentes

Primer	Sequenz (5'-3')	G/C-Gehalt [%]	Tm [°C]	Hersteller
ITS-f	TTG ATT ACG TCC CTG CCC TTT	47,6	62	MWG
ITS-r	ACG AGC CGA GTG ATC CAC CG	65,0	66	MWG

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen für einen 25 µl Ansatz durchgeführt:

Tab. 11: PCR-Ansatz zur Amplifikation der ITS-1-Region der rDNA

Reagenzlösung	Stammlösung	Finale Konzentration
Puffer	10 x	1 x
MgCl ₂	15 mM	1,5 mM
dNTPs	10 mM	200 µM
Primer-Mix (Primer 1+ 2)	10 µM	1 µM
Taq-Polymerase	5 U	1,25 U
Template-DNA	1 ng/µl	2,0 ng

Die Reaktionsbedingungen für die PCR sind in der Tabelle 12 aufgeführt.

Tab. 12: Thermocycler-Programm der PCR zur Amplifikation der ITS-1-Region auf einem PTC 200 (Heizdeckeltemperatur: 105 °C)

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
35 Zyklen		
Denaturierung	95	0:45
Annealing	52	1:00
DNA-Amplifikation	72	2:00
Abschluss		
Kühlung	4	∞

Nach der PCR wurden die ITS-1-Proben in einem 2,0 %igen und 2,5 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid angefärbt. Zur Größenorientierung wurde auf dem Gel ein 100 bp-Marker (Gibco) eingesetzt. Die Identifikation des ITS-1-Fragmentes erfolgte visuell auf dem Agarosegel mit Hilfe des Biodoc-Systems und einer späteren genauen Bestimmung der DNA-Bandengröße durch das Programm ScanPack™ 3.0.

2.4.4 RFLP-Analyse von ITS-1-Fragmenten

Das PCR-Produkt mit dem enthaltenen ITS-1-Fragment wurde mit Restriktionsenzymen gespalten, um Fragmente unterschiedlicher Größe zu erhalten. Bei der Auswahl der Restriktionsenzyme wurde auf die Erfahrung von Restriktionsspaltungen bei ITS-Fragmenten von Nematoden zurückgegriffen (pers. Mitt. BURGERMEISTER, 2003). Folgende Enzyme sind für die RFLP (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus) mit allen Standorten der Z- und E-Rasse erprobt worden: HinfI, BsuRI (HaeIII), AluI, MspI und RsaI. Da nur für die Enzyme HaeIII und RsaI Restriktionsschnittstellen in den 505 bp-Fragmenten gefunden wurden, sind mit diesen beiden Enzymen jeweils fünf Standorte der Z- und E-Rasse von *O. nubilalis* getestet worden (Tab. 13).

Tab. 13: Charakterisierung und Konzentration der in der RFLP verwendeten Restriktionsenzyme (MBI Fermentas)

Enzym	Herkunft	Erkennungssequenz	Stammlösung	Finale Konzentration
RsaI	<i>Rhodopseudomona sphaeroides</i>	5'...GT↓AC...3'	10 U/μl	1,1 U/μl
		3'...CA↑TG...5'		
HaeIII	<i>Bacillus subtilis</i> R	5'...GG↓CC...3'	10 U/μl	1,1 U/μl
		3'...CC↑GG...5'		

Die Reaktionsbedingungen für die RFLP sind in der Tabelle 14 aufgeführt.

Tab. 14: Reaktionskomponenten für die RFLP von DNA des Maiszünsler *O. nubilalis* mit den Enzymen RsaI und HaeIII

Reagenzlösung	Stammlösung	Finale Konzentration
Reaktionspuffer	10 x	1 x
Enzym	10 U/μl	1,1 U/μl
ddH ₂ O	-	6,5 μl
Template-DNA	-	2,0 μl vom ITS-1-Fragment

Die Spaltprodukte der ITS-1-Fragmente wurden nach dem Restriktionsverdau auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen und nach der Elektrophorese mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht. Im Anschluss daran erfolgte durch die computergestützte Anwendung des Programms ScanPack™ 3.0 eine genaue Größenbestimmung der einzelnen Fragmente.

2.4.5 TGGE-Analyse von ITS-1-Fragmenten

Da bei der ITS-RFLP nur Unterschiede innerhalb der Restriktionsschnittstelle detektiert werden, können außerhalb dieses Bereiches weitere Unterschiede in der Sequenz vorliegen. Solche Unterschiede können z. B. mit der TGGE (Temperatur Gradienten Gel Elektrophorese) erfasst werden, die einzelne Punktmutationen innerhalb der ITS-Sequenz aufzeigen kann. Gegenüber der konventionellen Elektrophorese, bei der Moleküle nach ihrer Größe oder Ladung aufgetrennt werden, bietet die TGGE die Möglichkeit, gleichlange Moleküle mit unterschiedlicher Sequenz nach Änderungen in ihrer

Konformation aufzutrennen (HEUER et al., 2001). Die DNA-Moleküle gelangen bei ihrer Wanderung durch das Gel in immer stärker denaturierende Bedingungen bis das Aufschmelzen einer größeren Domäne die Beweglichkeit im Gel stark einschränkt (BACKHAUS, 1995). Die Phase stark eingeschränkter Wanderung aufgrund eintretender sterischer Hinderung setzt sequenzabhängig bei unterschiedlichen Temperaturen ein und bewirkt die Auftrennung unterschiedlicher Sequenzen der gleichlangen PCR-Produkte. Durch die Verlängerung der DNA-Moleküle an einem Ende mit G/C reichen Sequenzen (GC-Klammer) wird ihr vollständiges Aufschmelzen während der TGGE verhindert (NÜBEL et al., 1996). Bei kurzen analysierten Sequenzen, die eine einzige Schmelzdomäne enthalten, können dann nahezu alle Sequenzunterschiede detektiert werden. Es gibt zwei Arten der TGGE, die perpendiculare TGGE und die parallele TGGE. Die perpendiculare TGGE dient der Abschätzung des Schmelzbereiches. Die auf dem Gel sichtbare sigmoide Kurve kennzeichnet durch das starke Abknicken der Kurve den Bereich der charakteristischen Schmelztemperatur des DNA-Moleküls. Dieser Temperaturbereich wird dann für die parallele TGGE über die ganze Länge des Gels gespreizt.

Für die PCR wurde ein ITS-1-Fragment-Amplifikat auf 1:10 verdünnt und davon 1 ng in die PCR eingesetzt (Tab. 11) und mit jeweils einer GC-Klammer (Primer ITS-f und Primer GC-r; Primer ITS-r und Primer GC-f) versehen. Die Reaktionsbedingungen der PCR sind in der Tabelle 12 ersichtlich. Die Sequenzstruktur der GC-reichen Primer, ihr G/C-Gehalt und ihre Schmelztemperatur sind in Tab. 15 zusammengestellt.

Tab. 15: Sequenz, G/C-Gehalt und Schmelztemperatur der ITS-1-Primer mit GC-Klammer (ITS-1-spezifische Sequenz **fett** gekennzeichnet)

Primer	Sequenz (5'-3')	G/C-Gehalt [%]	Tm [°C]
ITS-f-GC	CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GTT GAT TAC GTC CCT GCC CTT T	80,3	> 75
ITS-r-GC	CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC GAG CCG AGT GAT CCA CCG	86,7	> 75

Das Polyacrylamidgel (45 ml 7 M TGGE-Stammlösung, 200 µl 0,01 % Ammoniumpersulfat, 77,7 µl TEMED) wurde in eine aus zwei Glasplatten bestehende und mit einer Folie beschichtete Form gegossen. Anschließend wurde das ausgehärtete Gel auf eine Keramikplatte mit regulierbaren Temperaturgradienten überführt. Nach Überführung des Mops-Puffers in die Elektrophoresekammer wurde ein Vorlauf für 15 min mit 500 V, 34 mA und 16 W durchgeführt. Anschließend wurde in jede Geltasche eine Mischung von 5 µl DNA-Lösung und 1,1 µl Gelladungspuffer eingefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für ca. 3 h bei gleicher Spannung und Stromstärke und gleichzeitiger Inbetriebnahme von zwei Wasserbädern mit der jeweils gewünschten Temperatur.

Bei der perpendicularen TGGE wurde ein Gradient von 30 °C – 60 °C eingestellt. Der daraus ermittelte optimale Temperaturgradient von 37 °C – 42 °C wurde in der linearen TGGE für die Primer mit GC-Klammer berücksichtigt. Mit einer Referenzprobe wurde eine perpendicularer TGGE (Temperaturgradient senkrecht zur Laufrichtung der Probe) und mit neun Z-Rasse- und sechs E-Rasse-Isolaten eine parallele TGGE (Temperaturgradient in Laufrichtung der Probe) durchgeführt. Bei der Z-Rasse handelte es sich um die Lokalpopulationen Oderbruch, Halle, Niedernberg, Freiburg, Bonn, Bodensee und Karlsruhe. Für die Untersuchung von Lokalpopulationen der E-Rasse wurden die Standorte Halle, Hessisches Ried, Bonn, Göttingen, Lintel und Niedernberg herangezogen. Zur Erzielung optimaler Sequenzunterschiede wurden die zwei GC-reichen Primer und verschiedene Temperaturgradienten ausgetestet.

Nach der Beendigung des Trennungsverfahrens wurde eine **Silberfärbung** durchgeführt:

1. Fixierung des Gel für 3 min in 150 ml Fixierungslösung;
2. 15 min in 150 ml Färbelösung;
3. 2 min unter destilliertes Wasser waschen;
4. 20 min in 150 ml Entwicklerlösung;
5. 5 min in Fixierlösung;
6. 5 min in destilliertes Wasser waschen;
7. 7 min in 250 ml Konservierungslösung geben.

Anschließend wird das Gel im Wärmeschrank bei einer Temperatur von 50 °C – 55 °C getrocknet. Nach Auftrennung der PCR-Produkte auf dem Polyacrylamidgel ist durch visuelle Betrachtung der gefärbten Fragmente eine Aussage in Hinsicht auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den verschiedenen Herkünften und Rassen getroffen worden. Die Lösungen für die Silberfärbung befinden sich im Anhang 3.

2.4.6 Sequenzierung von ITS-1-Fragmenten

In Zusammenarbeit mit der Firma CONGEN Biotechnologie GmbH wurden die amplifizierten ITS-1-Fragmente von mehreren Standorten sequenziert. Bei dieser Art der Sequenzierung werden 2',3'-Dideoxynucleotid-Triphosphat (ddNTP) eingesetzt, die entsprechend der vier unterschiedlichen Nukleotide mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen endmarkiert sind. Mit Hilfe eines Cyclesequencing-Ansatzes werden unterschiedlich lange einzelsträngige PCR-Produkte synthetisiert, die anschließend nach dem Prinzip der Sanger-Kettenabbruchmethode (SANGER et al., 1977) sequenziert werden.

Zu den sieben ausgewählten Standorten der Z-Rasse zählten: Oderbruch, Hessisches Ried, Niedernberg, Freiburg, Pocking, Karlsruhe und Bodensee. Bei der E-Rasse wurden die drei Standorte Lintel, Göttingen und Bonn untersucht. Weiterhin wurden ITS-1-Fragmente von zwei ausländischen Lokalpopulationen der Z-Rasse, aus Frankreich (Region Toulouse) und Polen (Przemysl), sowie zwei Einzeltiere des Standortes Oderbruch (Z-Rasse) untersucht. Jede Probe wurde in zwei verschiedenen Ansätzen jeweils einmal mit dem *forward* bzw. dem *reverse* Primer sequenziert. Für die Sequenzierungsreaktion wurde das „ABI PRISM[®] BigDye[®] Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit“ (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Der Kit enthielt neben Puffer und MgCl₂, AmpliTaq[®] Polymerase, Desoxynukleotide und fluoreszenzmarkierte Dideoxynukleotide für die Termination (Tab. 16). Für die Sequenzierungsreaktion wurden die bekannten ITS-Primer verwendet.

Tab. 16: PCR-Ansatz für das Cyclesequencing für lange Fragmente ab 300 bp

Reagenzlösung	Stammlösung	Endkonzentration
Terminationsmix	ABI PRISM [®] Big Dye [®]	20 %
Primer	10 µM	5 µM
DNA-Probe	DNA-Messung mit Hilfe eines Spectrophotometers	10 ng pro 100 bp
Wasser	-	auf 20 µl auffüllen

Das Temperaturprofil mit 25 Zyklen bestand aus der initialen Denaturierung bei 95 °C für 10 s, Annealing bei 50 °C für 5 s und der DNA-Amplifikation bei 60 °C für 4 min. Danach wurden die Proben auf 4 °C gekühlt.

Nach der Reinigung der PCR-Produkte von überschüssigen Primern, Nukleotiden und Terminatoren mit Sephadex G-50 (Pharmacia) (siehe Anhang 3) wurden die Proben in

einer Vakuumzentrifuge eingedampft und die Pellets anschließend mit 15 µl TSR-Puffer (PE Applied Biosystems) erneut in Lösung gebracht. Nach 2 min Denaturierung bei 93° C wurden die gereinigten PCR-Produkte in den Sequenzierer ABI Prism 310 Genetic Analyzer überführt.

Die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wurden mit einer kurzen Kapillare, dem POP 6-Polymer (PE Applied Biosystems) bei einer Temperatur von 50 °C, einer Injektionszeit von 30 s bei einer Spannung von 2,5 kV (während des Laufs 12,2 kV, 6 µA) und einer Laufzeit von über 90 min pro Probe elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Auswertung der Verläufe erfolgte sowohl mit dem *forward* als auch mit dem *reverse* Primer. Damit konnten Sequenzungenauigkeiten innerhalb einer Probe abgeglichen werden, die gerade am Anfang oder Ende eines Sequenzierungslaufes auftreten. Die Auswertung der Sequenzierungsläufe erfolgte mit dem Programm MT Navigator 1.0.2b3 (Perkin-Elmer). Das Alignment zwischen den verschiedenen Herkünften wurde mit dem Programm Bioedit 5.0.9 (Tom Hall, Department of Microbiology, North Carolina State University, USA) ausgeführt. Die Sequenzdaten wurden als Datei abgelegt.

2.4.7 T-RFLP der *O. nubilalis*-assoziierten Mikroflora

Bei der T-RFLP-Analyse (Terminale Restriktions-Fragment-Analyse) werden genetische Fingerabdrücke von komplexen Lebensgemeinschaften erstellt. Zunächst werden die amplifizierten Genabschnitte der PCR mit Hilfe eines Restriktionsenzym sequenzspezifisch geschnitten. Bei der Auftrennung der Fragmente wird nicht das komplette Fragmentmuster aufgetrennt, sondern nur das terminale Restriktionsfragment, das durch den fluoreszenzmarkierten Primer markiert wurde. Das Ziel war mit Hilfe der T-RFLP, einen Vergleich der Mikroflora zwischen den ausgewählten *O. nubilalis*-Standorten aufzuzeigen. Eine weitere Überlegung bestand darin, anhand der identifizierten Bakterienspektren einen Verwandtschaftsgrad (monophyletische Gruppen) in Beziehung zu den verschiedenen lokalen *O. nubilalis*-Populationen herzustellen. Bei der Prüfung der Bakterienzusammensetzung in den verschiedenen lokalen *O. nubilalis*-Populationen ist die T-RFLP in Kooperation mit dem Institut für Primärproduktion und Mikrobielle Ökologie am Zentrum für Agrarlandschafts- und Landnutzungsforschung (ZALF) in Müncheberg durchgeführt worden. Dort wurden seit mehreren Jahren Erfahrungen in der Charakterisierung von mikrobiellen Gesellschaften in der Rhizo- und Phyllosphäre gesammelt.

Folgende Reaktionsschritte wurden in der T-RFLP durchgeführt:

1. Amplifikation der 16S rDNA, dabei ist nur der Primer 1492r mit dem Fluoreszenzfarbstoff 6-FAM (Wellenlänge 535 nm) markiert; bei dem Längenstandard wurde der ROX-Farbstoff (Wellenlänge 615 nm) verwendet;
2. Reinigung der PCR-Produkte mit dem Quiaquick PCR Reinigungskit;
3. Spaltung der PCR-Produkte mit Restriktionsenzymen;
4. Reinigung der DNA durch Fällung;
5. Versetzung der Proben mit dem Standard für die Kapillar-Elektrophorese;
6. Auswertung der terminalen Restriktionsfragmente (T-RF-Profile).

Für die PCR-Reaktion wurden bakterienspezifische Primer (Tab. 17) verwendet, die neben der 16S rDNA theoretisch auch mitochondriale DNA vervielfältigen (LANE, 1991 zitiert in: CHELIUS & TRIPLETT, 2001), jedoch eukaryotische und Chloroplasten-DNA ausschließen (CHELIUS & TRIPLETT, 2001).

Es wurden zwei verschiedene T-RFLP-Analysen durchgeführt. In der ersten Untersuchung wurden die verschiedenen Körperregionen Kopf, Thorax (bestehend aus Pro-, Meso- und Metathorax), Abdomen und Darm analysiert, in der zweiten Untersuchung wurden acht Lokalpopulationen (20er-Tierproben) auf ihr Bakterienspektrum analysiert. Zwei von diesen Lokalpopulationen stammten aus Laborzuchten der Universität Aachen.

Tab. 17: Sequenz, G/C-Gehalt und Schmelztemperatur der bakterienspezifischen Primer für die T-RFLP

Primer	Sequenz (5´-3´)	G/C-Gehalt [%]	Tm [°C]
799f	AAC MGG ATT AGA TAC CCK G	42,1 – 52,6	54 - 62
1492r	TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T	40,9 – 45,5	62 - 64

Erklärung: M = A oder C; K = G oder T; Y = C oder T

Für einen 50 µl-Ansatz wurden folgende PCR-Reagentien und Konzentrationen eingesetzt:

Tab. 18: PCR-Ansatz für die T-RFLP bei bakterieller rDNA

Reagenzlösung	Stammlösung	Finale Konzentration
Polymerasepuffer	10 x	1 x
Mg Cl ₂	25 mM	1,75 mM
dNTPs	20 mM	200 µM
Mix von 2 Primern	50 µM	0,5 µM
Taq-Polymerase	5 U	2,5 U
Template-DNA	1 ng/µl	2,0 ng

Die Thermocycler-Bedingungen wurden von CHELIUS & TRIPLETT (2001) übernommen (Tab. 19).

Tab. 19: Thermocycler-Programm der PCR zur T-RFLP auf einem PTC 200 (Heizdeckeltemperatur: 105 °C)

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]
Initial-Denaturierung	95	3:00
30 Zyklen		
Denaturierung	94	0:20
Annealing	53	0:40
DNA-Amplifikation	72	0:40
Abschluss		
Final-Extension	72	7:00
Kühlung	4	∞

Nach der Reinigung der PCR-Produkte mit dem Qiaquick PCR Reinigungskit (Qiagen) wurde für die Analyse der verschiedenen Körperteile von *O. nubilalis*-Larven eine Spaltung mit dem Restriktionsenzym TaqI und für den Vergleich der ausgewählten *O. nubilalis*-Standorte (20er-Gruppen) das Restriktionsenzym HhaI (Tab. 20) verwendet. Beide besitzen eine 4-bp-Erkennungsregion. Die Reaktionskomponenten und ihre jeweiligen Konzentrationen sind in Tab. 21 aufgelistet.

Tab. 20: Charakterisierung und Konzentration der verwendeten Restriktionsenzyme HhaI und TaqI

Enzym	Herkunft	Erkennungssequenz	Stammlösung	Finale Konzentration
HhaI	<i>Haemophilus</i>	5'...GCG↓C...3'	20 000 U/ml	10 U
	<i>haemolyticus</i>	3'...C↑GCG...5'		
TaqI	<i>Thermus</i>	5'...TCG↓A...3'	20 000 U/ml	10 U
	<i>aquaticus</i>	3'...A↑GCT...5'		

Tab. 21: Reaktionskomponenten für die RFLP von bakterieller rDNA mit den Enzymen HhaI und TaqI

Reagenzlösung	Stammlösung	Finale Konzentration
NE Buffer 4	10 x	1 x
BSA	100 x	1 x
Enzym	20 000 U/ml	10 U
Template-DNA	-	3,0 µl PCR-Produkt

Anschließend wurde eine Fällung und Reinigung der DNA mit 75 % Isopropanol, eine Trocknung unter Vakuum-Bedingungen, Resuspension mit 20 µl HPLC-Wasser durchgeführt und 0,5 µl eines verdünnten internen Längenstandards (GenScan 500 Rox – bei 20er-Pop., GenScan 1000 Rox – bei verschiedenen Körperregionen, Applied Biosystems, Weiterstadt) zugegeben. Nach Denaturierung für 2 min bei 95 °C und Überführung der Proben auf Eis wurden diese einer denaturierenden Fragmentanalyse durch die Kapillarelektrophorese mit dem POP 6-Polymer (PE Applied Biosystems) im Sequenzierer ABI PRISM 310 unterzogen. Dort wurden die Fragmente in einer kurzen Kapillare bei einer Temperatur von 60 °C, einer Injektionszeit von 20 s bei 2 kV und einer Laufzeit von 80 min bei 15 kV pro Probe nach ihrer Größe aufgetrennt. Bei der graphischen Darstellung im Densitogramm gibt die x-Achse die Fragmentgröße und die y-Achse die Fragmentmenge an.

Die Auswertung der entstandenen T-RF-Profile erfolgte mit der Analysesoftware GeneScan®3.1.2 (PE Applied Biosystems). Durch den zeitgleichen Lauf des internen Längenstandards mit den untersuchten Proben wird eine korrekte Größenermittlung ermöglicht. Eine Quantifizierung ist durch die unterschiedlich starken Fluoreszenzsignale möglich, die Aussagen über die relative Abundanz eines bestimmten T-RFs in Bezug auf die Summe der Fluoreszenzsignale aller Fragmente innerhalb einer Probe ermöglichen.

3 ERGEBNISSE

Zunächst war es notwendig, für alle populationsgenetischen Untersuchungen die DNA-Extraktionsmethode, die PCR-Bedingungen und die Zusammensetzung der Template-DNA auszuwählen und zu optimieren.

3.1 DNA-Extraktion (Template-DNA)

Die Extraktion erfolgte nach der leicht modifizierten Methode von DELLAPORTA et al. (1983). Die aus 20 mg - 30 mg Larvenmaterial extrahierte DNA war wenig geschert (Tab. 22), so dass für die weiteren Tests auf hochmolekulare DNA zurückgegriffen werden konnte. Die Qualität der aus *O. nubilalis*-Larven extrahierten DNA erreichte das Niveau der als Vergleich eingesetzten gereinigten Kalbs-Thymus-DNA (Tab. 22). Die Ausbeuten an DNA lagen trotz eines standardisierten Protokolls, möglicherweise aufgrund unterschiedlicher Fettgehalte der Larven, in einem weiten Bereich zwischen 8,8 ng/µl – 78,6 ng/µl. Bei einer Probe aus Niedernberg im Jahr 1999 wurde sogar nur 4 ng/µl DNA gewonnen. Sowohl die fluorometrische Quantifizierung der DNA als auch die Abschätzung der DNA über den Vergleich mit einer definierten Menge Thymus-DNA führten zu vergleichbaren Messergebnissen. Für die RAPD-PCR wurden aus der Stammlösung Arbeitslösungen von 2 ng/µl hergestellt. Damit war die Menge an DNA einer Extraktion ausreichend für alle PCR-Untersuchungen.

Tab. 22: Fluorometrisch gemessene Template-DNA-Menge (5 µl) und entsprechende Elektrophorese-Banden von verschiedenen lokalen *O. nubilalis*-Populationen aus den Jahren 1999, 2000 und 2001 im Vergleich mit DNA anderer Herkunft

Standort	Jahr	DNA-Gehalt [ng/5 µl]	Bande in 1,2 % Agarose
Oderbruch	1999	131	
Halle	1999	63	
Niedernberg	1999	20	
Hessisches Ried	1999	44	
Karlsruhe	1999	55	
Pocking	1999	91	
Bonn	1999	138	
Oderbruch 1	2000	87	
Oderbruch 2	2000	303	
Halle	2000	50	
Niedernberg	2000	48	
Hessisches Ried	2000	73	
Karlsruhe	2000	130	
Pocking	2000	64	
Bodensee	2000	155	
Oderbruch 1	2001	47	
Oderbruch 2	2001	50	
Halle	2001	52	
Niedernberg	2001	119	
Hessisches Ried	2001	162	
Freiburg	2001	138	
Pocking	2001	89	
Bonn	2001	79	
<i>Ephestia kühnella</i>	2000	393	
<i>Plodia interpunctella</i>	2000	218	
Thymus 1	--	250	
Thymus 2	--	125	
Thymus 3	--	63	
Thymus 4	--	31	

Zum Vergleich wurden bei einigen Proben erneute Extraktionen des gleichen Ausgangsmaterials durchgeführt. Hierbei zeigten sich Unterschiede in den RAPD-Mustern bei einem der beiden eingesetzten Primern (OPB-08, OPC-15) zwischen den Extraktionen einer Ausgangsprobe. Während beim Primer OPB-08 in beiden Extraktionen das gleiche RAPD-Muster erzielt wurde, ergaben sich beim Primer OPC-15 Unterschiede (Abb. 12). Eine Verdopplung der Ausgangsmenge von 30 mg auf 60 mg führte bei beiden Primern zu keinen Unterschieden in den RAPD-Mustern. Daraus kann gefolgert werden, dass geringe Unterschiede in der Qualität der DNA bei verschiedenen Extraktionen aus einer Ausgangsprobe von einigen Primern widerspiegelt werden. Bei Verwendung einer

großen Anzahl an Primern sind keine starken Auswirkungen auf das Gesamtergebnis zu erwarten.

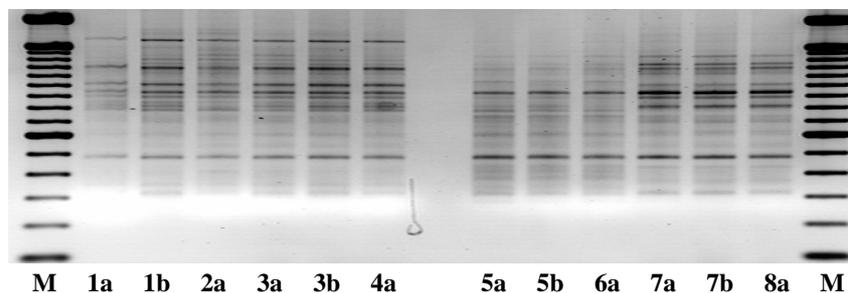


Abb. 12: Effekte von unabhängigen Extraktionen des selben Ausgangsmaterials bei unterschiedlichen Template-Mengen auf die RAPD-Muster des Primers OPC-15 (**1 – 4** = 1. 20er Gruppe, **5 – 8** = 2. 20er Gruppe; **1, 2, 5, 6** = 1. Extraktion, **3, 4, 7, 8** = 2. Extraktion; **1, 5** = 30 mg Ausgangsmaterial und 2 μ l Template unverdünnt, **2, 6** = 30 mg Ausgangsmaterial und 2 μ l Template mit 1 ng/ μ l, **3, 7** = 30 mg Ausgangsmaterial und 2 μ l Template mit 1 ng/ μ l, **4, 8** = 60 mg Ausgangsmaterial und 2 μ l Template mit 1 ng/ μ l; **a, b** = Wiederholungen; **M** = 100 bp -Marker)

YOON et al. (1993) vermuten, dass sich mitextrahierte RNA als Primer an einen DNA-Einzelstrang binden könnte. In einem Test wurde ein möglicher störender Effekt der RNA als Template oder Primer auf die RAPD-Muster hinterfragt. Hierfür dienten Untersuchungen mit isolierter DNA und RNA aus einem Agarosegel. Die Ergebnisse zeigen, dass nur mit DNA RAPD-Muster erzeugt wurden, während bei Verwendung der RNA diese auch aufgrund der sehr geringen Reverse-Transkriptase-Aktivität des Stoffelfragmentes ausblieben (Abb. 13). Bei Verwendung des DNA/RNA-Gemisches ohne Primer, d. h. die RNA Moleküle sollten die Funktion des Primers übernehmen, blieb die Bildung von PCR-Banden aus.

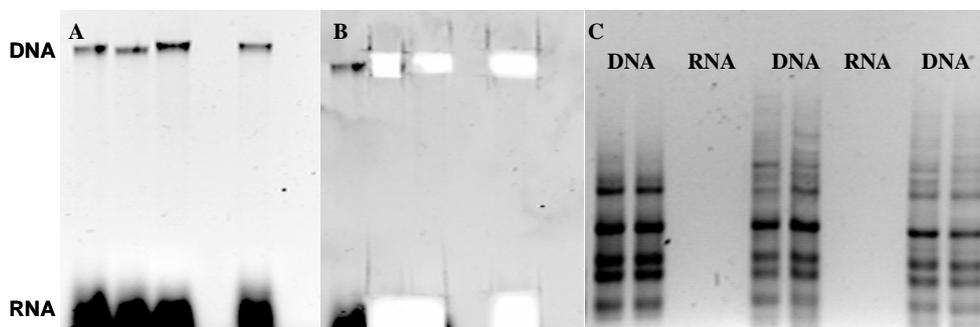


Abb. 13: Einfluss von RNA auf die RAPD-Muster des Primers OPA-07 (**A** = RNA und DNA im Agarosegel, **B** = Trennung von DNA und RNA aus dem Agarosegel, **C** = RAPD-PCR mit DNA und RNA)

Für die Bewertung der Lagerstabilität von DNA bei 4 °C wurden am Beispiel von DNA-Extrakten aus *Plodia interpunctella* und *Ephestia kuehniella* mit den drei Primern OPA-07, OPB-08 und OPC-15 im Abstand von einem Jahr RAPD-Muster erzeugt und verglichen. Hierbei konnten keine für die Auswertung nachteiligen Unterschiede festgestellt werden (Abb. 14).

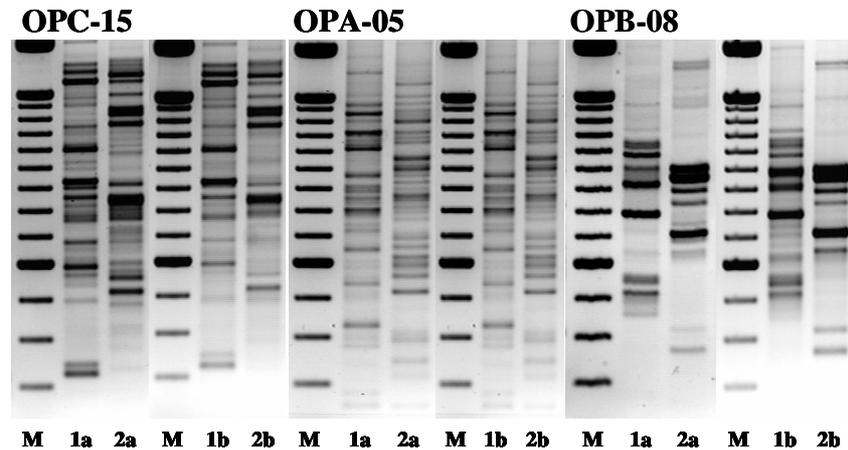


Abb. 14: Reproduzierbarkeit der RAPD-Muster mit den der Primern OPC-15, OPA-05, OPB-08 (**1** = *Ephestia kuehniella*, **2** = *Plodia interpunctella*; **a** = Jahr 2000, **b** = Jahr 2001; **M** = 100 bp –Marker)

Fazit: Die Extraktion von *O. nubilalis*-DNA nach einem modifizierten Protokoll von DELLAPORTA et al. (1983) führte zu ausreichenden Mengen hochmolekularer und lagerstabiler DNA. Die Verwendung von DNA aus einer neuen Extraktion des gleichen Ausgangsmaterials kann allerdings zu geringfügigen Modifikationen in den RAPD-Mustern beitragen.

3.2 RAPD-Analyse der genomischen von *O. nubilalis*-DNA

3.2.1 Optimierung der Reaktionsbedingungen für die RAPD-PCR

Die einzelnen Reaktionsparameter wurden zunächst basierend auf den mit Nematoden gewonnenen Erfahrungen von PASTRIK et al. (1995) übernommen und nachfolgend eigene Optimierungen für die RAPD-PCR mit *O. nubilalis*-DNA vorgenommen. Folgende Parameter wurden berücksichtigt:

- a) MgCl₂-Konzentration;
- b) Polymerase-Arten und –Konzentrationen;
- c) dNTP-Konzentration;

- d) Primer-Auswahl und –Konzentration;
- e) DNA-Menge;
- f) Thermocycler-Programm.

a) MgCl₂-Konzentration

Magnesiumchlorid (MgCl₂) ist ein essentieller Co-Faktor für die DNA-Polymerase, da die Magnesium-Ionen mit den dNTPs einen löslichen Komplex bilden, der für die Extension der PCR-Produkte ausschlaggebend ist. Für die Optimierung wurden Konzentrationen zwischen 2,5 mM – 6 mM getestet. Die besten Ergebnisse wurden zwischen 4 mM und 5 mM erzielt. Höhere Konzentrationen (5 mM und 6 mM) begünstigten vor allem die Bildung großer PCR-Banden ab 1 300 bp. Für die PCR-Arbeiten wurde die Konzentration von 4 mM ausgewählt.

b) Polymerase-Arten und -Konzentrationen

Neben dem in RAPD-Untersuchungen häufig verwendeten und daher von uns favorisierte Polymerase Stoffelfragment (Applied Biosystems) wurde die Polymerase AmpliTaq (Qiagen) mit und ohne Q-Solution (Qiagen) verwendet. Bei der Q-Solution handelt es sich um ein innovatives PCR-Additiv, das die Amplifikation schwieriger DNA-Templates durch Beeinflussung des Schmelzverhaltens der DNA erleichtert. Deshalb wurde auch das Stoffelfragment mit der Q-Solution getestet.

Beide Polymerasen mit und ohne Q-Solution haben gute RAPD-Muster erzeugt. Unterschiede zwischen beiden Polymerasen bestanden in einer stärkeren Amplifikation kleiner (ab 400 bp) beim Stoffelfragment bzw. großer (ab 2 000 bp) Banden bei der AmpliTaq (Abb. 15). Die Zugabe der Q-Solution brachte bei der AmpliTaq-Polymerase, aber nicht bei der Polymerase Stoffelfragment, eine Verbesserung. Für die weiteren Untersuchungen wurde aufgrund der besseren Amplifikation der kleineren Banden die Polymerase Stoffelfragment ohne Q-Solution ausgewählt.

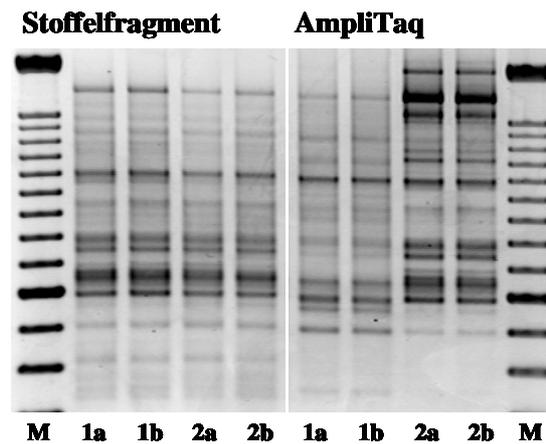


Abb. 15: Effekte der Polymerasen Stoffelfragment und AmpliTaq mit und ohne Q-Solution auf die RAPD-Muster des Primer OPD-11 (1 = ohne Q-Solution, 2 = mit Q-Solution; a, b = Wiederholungen; M = 100 bp-Marker)

In einem weiteren Test zur optimalen Konzentration der Polymerase Stoffelfragment ergab sich aus dem Bereich von 2 U bis 6 U eine optimale Konzentration ab 5 U pro Reaktionsgemisch (25 μ l).

c) dNTP-Konzentration

Die vier 2'-Desoxynukleotid-5'-triphosphate (dNTP) werden generell in einem Bereich von 50 μ M - 500 μ M angewandt. Der in dieser Arbeit getestete dNTP Bereich lag zwischen 100 μ M - 300 μ M. Die besten RAPD-Muster wurden bei den Konzentrationen von 150 μ M bis 300 μ M erreicht. Für alle anschließenden PCR-Reaktionen wurde mit einer dNTP-Konzentration von 200 μ M gearbeitet.

d) Konzentration und Auswahl der RAPD-Primer

Bei den 30 getesteten RAPD-Primern handelt es sich um 10 Basen große Oligonukleotide, die generell in einem Konzentrationsbereich von 0,1 μ M - 1 μ M eingesetzt werden. In den Arbeiten zur Optimierung wurden Konzentrationen zwischen 0,1 μ M – 0,4 μ M mit den Primern Roth-A 16 und Roth-A 03 geprüft. Bei Primer Roth-A 16 stellten sich optimale RAPD-Muster ab 0,3 μ M ein. Demgegenüber zeigte der Primer Roth-A 03 bei 0,1 μ M sein bestes Ergebnis. Dieser Primer führte in der PCR zu einer Vielzahl von eher unspezifischen PCR-Produkten, die bei den drei höheren Konzentrationen ein starkes, die Auswertung behinderndes Hintergrundrauschen verursachte. Da angestrebt wurde bei allen Primern mit einheitlichen Mengen an Reaktionskomponenten zu arbeiten, kam eine Primer-Konzentration von 0,2 μ M zur Anwendung (Abb. 16).

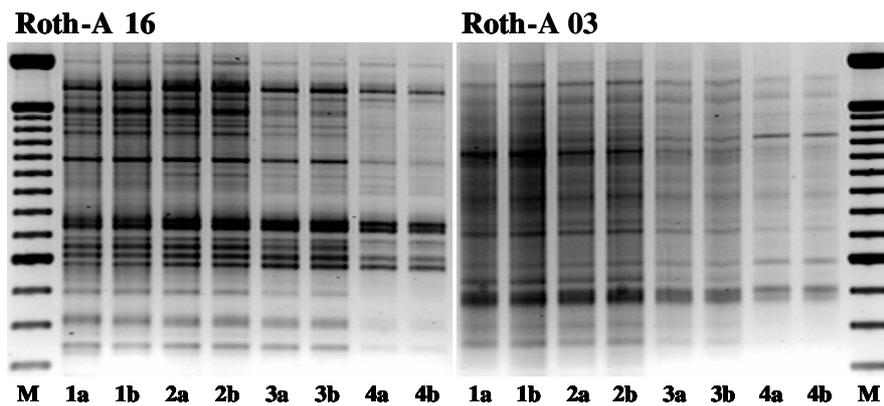


Abb. 16: Effekte der Primerkonzentration auf die RAPD-Muster eines gering (Roth-A16) und eines stark polymorphen Primers (Roth-A 03) (1 = 0,4 μ M, 2 = 0,3 μ M, 3 = 0,2 μ M, 4 = 0,1 μ M; a, b = Wiederholung; M = 100 bp -Marker)

Von den 30 getesteten Primern sind die Primer 1 bis 20 ausgewählt worden (Tab. 5), die hinsichtlich Anzahl und Intensität der PCR-Banden die besten Ergebnisse zeigten.

e) Konzentration der Template-DNA

Die Ermittlung der optimalen Menge an Template-DNA pro Reaktionsgemisch erfolgte mit dem Primer OPA-16 und einem Konzentrationsbereich von 50 ng bis 0,4 pg DNA.

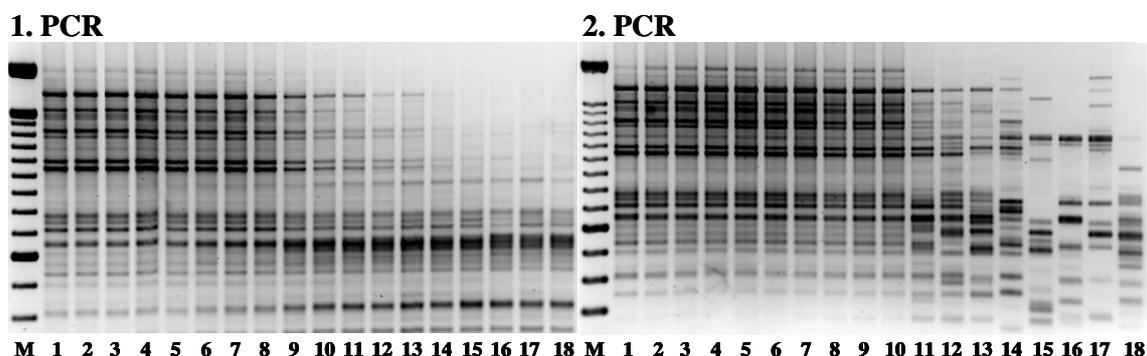


Abb. 17: Stabilität der RAPD-Muster des Primers Roth-A16 in Abhängigkeit von der Menge der Template-DNA und der Reproduzierbarkeit der PCR-Bedingungen (1 = 50 000 pg, 2 = 25 000 pg, 3 = 12 500 pg, 4 = 6 250 pg, 5 = 3 125 pg, 6 = 1 563 pg, 7 = 781 pg, 8 = 391 pg, 9 = 195 pg, 10 = 98 pg, 11 = 49 pg, 12 = 24 pg, 13 = 12 pg, 14 = 6 pg, 15 = 3 pg, 16 = 1,5 pg, 17 = 0,8 pg, 18 = 0,4 pg; M = 100 bp-Marker)

In allen Fällen wurde die gleiche Template-DNA (Standort Pocking 1999) verwendet. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt. In beiden Versuchen blieben die RAPD-Muster zwischen 400 bp – 900 bp über einen breiten Konzentrationsbereich von 50 ng bis 98 pg fast konstant. Bei Anwendung von DNA-Mengen kleiner 98 pg wichen die RAPD-Muster in beiden Versuchen erheblich voneinander ab (Abb. 17). Während im ersten Versuch PCR-Banden im Bereich von 500 bp – 800 bp erhalten blieben, größere Banden

verschwanden und kleinere hinzu kamen, zeigten die Muster im zweiten Versuch ab ca. 49 pg (Abb. 17, 2. PCR Spur 11) eine viel stärkere Abnahme der Musterhomogenität.

Für den Vergleich der verschiedenen lokalen *O. nubilalis*-Populationen wurde bei allen PCR-Reaktionen mit einer DNA-Konzentration von 2 ng pro Reaktionsgemisch gearbeitet. Da die fluorometrische DNA-Messung keine hohe Genauigkeit besitzt, lässt die gewählte DNA-Konzentration nach oben und unten ausreichend Spielraum, um den Einfluss der DNA-Menge auf die RAPD-Muster auszuschließen.

f) Thermocycler-Programm

Das Temperatur/Zeit-Profil für die PCR wurde zunächst aus SCHRADER (1996) übernommen und nach PORNKULWAT et al. (1998) modifiziert (Tab. 6). Die Optimierung konzentrierte sich einzig auf die Annealing-Temperatur. Der ausgewählte Gradient lag zwischen 36 °C und 44 °C. Im gesamten getesteten Temperaturbereich blieb das RAPD-Muster konstant (Abb. 18), daher wurde die von SCHRADER (1996) angewandte Annealingtemperatur von 38 °C beibehalten.

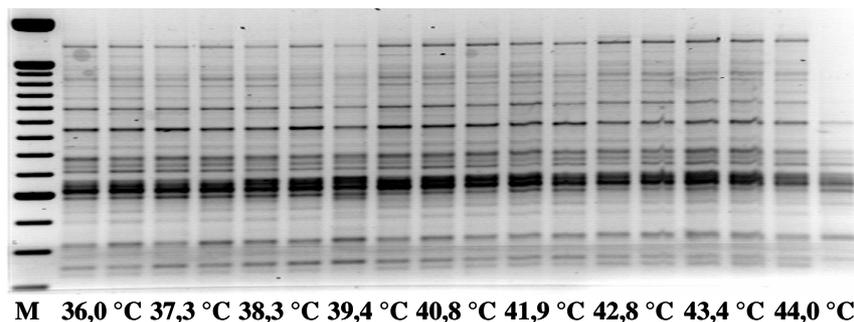


Abb. 18: Effekt der Annealingtemperatur auf das RAPD-Muster des Primers Roth-A16 (M = 100 bp -Marker; zwei Wiederholungen pro Temperatur)

Zur Reduzierung unspezifischer Bindungen der Primer bei 38 °C wurde die in MÜLLER (2001b) beschriebene Touch-Down-PCR getestet. Ihr Prinzip beruht auf einer sukzessiven Herabsetzung der Annealing-Temperatur während der ersten Zyklen. Dafür wurde folgende Einstellung vorgenommen: innerhalb der ersten 15 Zyklen eine Herabsetzung der Anfangstemperatur von 53 °C auf 38 °C (1 °C pro Zyklus). Diese Modifikation im Thermocycler-Programm führte zu keiner Verbesserung der RAPD-Muster (Abb. 19).

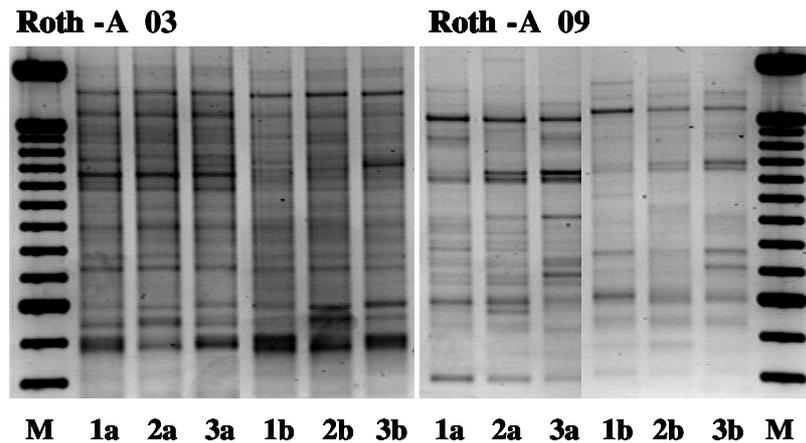


Abb. 19: Effekt der Touch-Down-PCR auf die RAPD-Muster der Primer Roth-A 03 und Roth-A 09 (1 = Niedernberg, 2 = Halle, 3 = Oderbruch; a = ohne Touch-Down-PCR, b = mit Touch-Down-PCR; M = 100 bp -Marker)

Zur thermischen Schonung der Taq-Polymerase wurde angestrebt, die Initial-Denaturierungszeiten niedrig zu halten. Es wurden Untersuchungen mit Zeitspannen von 2,5 min und 4 min durchgeführt und dabei festgestellt, dass bei der kürzeren Denaturierung keine Verschlechterung der RAPD-Muster eintrat. In den folgenden PCR-Ansätzen wurde deshalb die kürzere Zeit eingestellt.

Fazit: Folgende PCR-Parameter wurden als optimal für einen Reaktionsansatz von 25 μ l ermittelt: 5 U Stoffelfragment, 1x Stoffelpuffer, 4 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs, 0,2 μ M Primer und 2 ng Template-DNA. Alle DNA-Proben wurden parallel mit einem Primer amplifiziert und anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt.

3.2.2 Einfluss von Nichtziel-DNA auf die RAPD-Muster

Bei der RAPD-PCR können sowohl vor als auch während der PCR-Arbeiten Verunreinigungen mit unerwünschter DNA auftreten. So können bei der Extraktion von *O. nubilalis* in der enthaltenen Template-DNA Pflanzen-DNA (z. B. aus Mais) und Mikroben-DNA (z. B. aus Bakterien) vorhanden sein. Bei der anschließenden PCR kann Nichtziel-DNA über Wasser, Luft (Aerosole) und durch die Polymerase in das Reaktionsgemisch gelangen. Durch UV-Bestrahlung der Oberflächen in der PCR-Box sowie durch die Verwendung gestopfter Pipettenspitzen und anderer vorbeugender Maßnahmen konnten die Verunreinigungen vermindert werden. Die über das insektenpathogene Mikrosporidium (*Nosema spec.*) möglicherweise verursachte Verunreinigung der Template-DNA blieb unberücksichtigt.

3.2.2.1 Mais-DNA

Der Nachweis von Mais-DNA in der Template-DNA von *O. nubilalis* erfolgte mit den Primern hm3 und hm4 (Tab. 7), die eine spezifische Bande mit einer Größe von 175 bp amplifizieren. Hierfür wurden folgende Varianten getestet, wobei aus Mais extrahierte DNA als Positivkontrolle diente:

- V1) L5-Larven vom Feld nach der Maisernte;
- V2) L5-Larven aus der Zucht auf künstlichem Medium (u. a. mit Maisgrieß);
- V3) L1-Larven aus der Zucht an Maispflanzen;
- V4) L1-Larven aus der Zucht an Maispflanzen, aber zwei/zehn Tage ohne Futter;
- V5) Fäzes von Larven aus der Zucht an Maispflanzen.

Für die Ermittlung der Nachweisgrenze von Mais-DNA wurden folgende Verdünnungen getestet (ng/μl): $8,6 \times 10^{-3}$, $8,6 \times 10^{-4}$, $4,3 \times 10^{-4}$, $2,2 \times 10^{-4}$, $1,1 \times 10^{-4}$, $1,1 \times 10^{-8}$, $0,6 \times 10^{-8}$ und $0,3 \times 10^{-8}$. Noch bei einer Konzentration von $0,3 \times 10^{-8}$ ng/μl war eine deutliche Bande bei 175 bp sichtbar (Abb. 20).

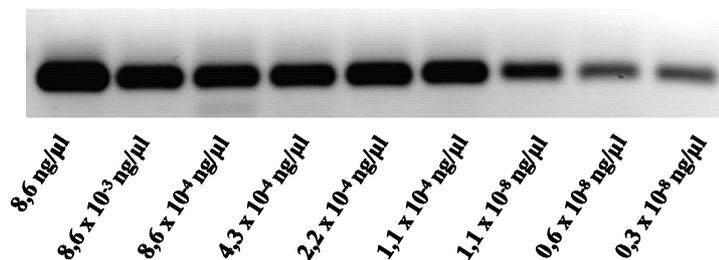


Abb. 20: Spezifischer PCR-Nachweis von Mais-DNA mit den Primern hm3 und hm4 bei unterschiedlichen Mengen von Template-DNA

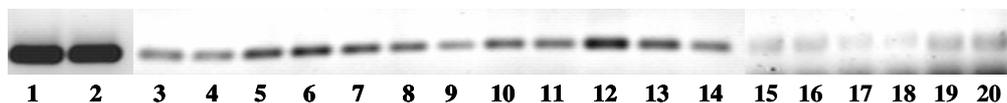


Abb. 21: Spezifischer PCR-Nachweis von Mais-DNA mit den Primern hm3 und hm4 in der Template-DNA von L1-Larven und deren Fäzes (1, 2 = Mais-DNA; 3, 4, 5 = Larven 5 d am Mais (V3); 6, 7, 8 = Larven 5 d am Mais und anschließend 2 d ohne Futter (V4); 9, 10, 11 = Larven 10 d am Mais (V3); 12, 13, 14 = Larven 10 d am Mais und anschließend 2 d ohne Futter (V4); 15, 16 = 1 d alte Fäzes von mehreren Larven (V5); 17, 18 = 3 d alte Fäzes von mehreren Larven (V5); 19, 20 = 1 d alte Fäzes vom Einzeltier (V5))

In den Varianten V1 und V2 ist keine Mais-spezifische Bande amplifiziert worden. Der Nachweis der spezifischen Mais-Bande von 175 bp gelang dagegen sehr gut in den Varianten V3 und V4 sowie etwas schwächer in der Variante V5 (Abb. 21).

Fazit: Mais-DNA war in geringsten Mengen nachweisbar. Die in den späteren populationsgenetischen Untersuchungen mit der RAPD-PCR eingesetzten L5-Larven verfügten jedoch im Gegensatz zu jüngeren Larvenstadien nicht über nachweisbare Mengen von Mais-DNA im Darm, die die RAPD-Muster hätten verfälschen können.

3.2.2.2 Darmmikroben-DNA

Der Darm von *O. nubilalis* wird von Mikroben besiedelt. Nach der Extraktion der *O. nubilalis*-DNA verunreinigt die Mikroben-DNA die Template-DNA, weil der Darm nicht entfernt wurde. Die möglicherweise dadurch verursachten Änderungen im RAPD-Muster können zu ungenauen Schlussfolgerungen führen. Diese Fragestellung wurde in einem Experiment mit Einzeltieren aus dem Oderbruch hinterfragt. Hierfür wurden folgende DNA-Varianten (Körperabschnitte) in den PCR-Untersuchungen eingesetzt: DNA-Extraktion aus dem Kopf, aus dem Thorax und aus dem Abdomen sowie aus isolierten Larvendärmen.

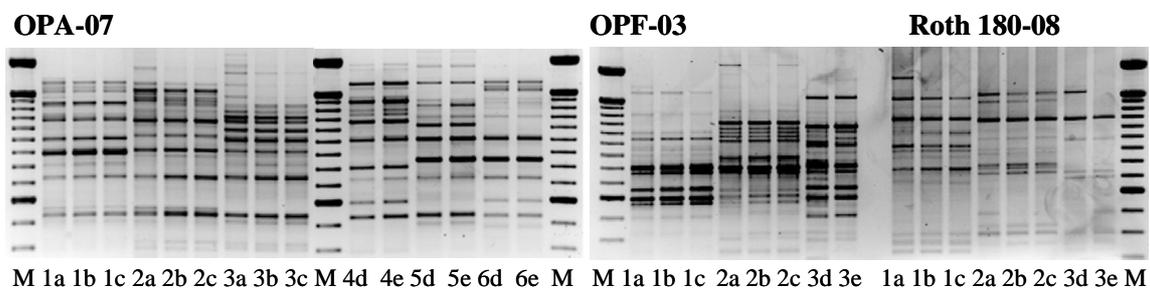


Abb. 22: Einfluss der gewebespezifischen Herkunft von Ziel-DNA auf das RAPD-Muster der Primer OPA-07, OPF-03 und Roth 180-08 (1 – 6 = Larven; a = Kopf, b = Thorax, c = Abdomen, d = Darm, e = Körperteil ohne Darm; M = 100 bp Marker)

Die RAPD-Muster aller vier Varianten zeigten keine bis geringe Variabilität. Insbesondere die RAPD-Muster der Kopf-DNA, die von allen Varianten am geringsten mit Nichtziel-DNA kontaminiert sein sollte, enthielten wenige zusätzliche Banden im Bereich >1500 bp (Abb. 22). Bei vier Proben (Abb. 22 OPA-07 2a; OPF-03 2a; Roth 180-08 1a) wurden im Kopf-Bereich zusätzliche Banden amplifiziert. Diese für RAPD-Muster eher seltenen Bandengrößen könnten Qualitätsunterschiede der Template-DNA aufzeigen, die auf

stärkere Wirkungen körpereigener Agentien (z. B. DNAasen) im Darm und Hämocoel während der Extraktion oder auf konkurrierende DNA-Kopien in der PCR zurückzuführen sind. Die wichtigste Aussage wurde jedoch aus dem Vergleich von einer Probe aus dem Darm und dem restlichen Körperteil ohne Darm getroffen. In fast allen Proben, mit Ausnahme der Probe Abb. 22 3d beim Primer Roth 180-08, sind in diesen Darmproben keine zusätzlichen Banden amplifiziert worden. Da bei einer Larve im Darmbereich eine zusätzliche Bande von ca. 1500 bp des Primers Roth 180-08 (Abb. 22 3d) amplifiziert wurde, die jedoch auch bei einer anderen Larve im Kopf-DNA-Extrakt auftrat (Abb. 22 2a), handelt es sich wahrscheinlich nicht um bakterielle DNA. Daher kann für die populationsgenetischen Untersuchungen auf eine aufwendige Eliminierung des Darmes oder auf eine Extraktion von speziellen Körperabschnitten (z. B. Kopf) verzichtet werden.

Dass dennoch Bakterien-DNA im DNA-Extrakt der Larven enthalten war, wurde auf Basis der 16S rDNA nachgewiesen. Die mit Hilfe der T-RFLP durchgeführte Charakterisierung der Bakterien-DNA von verschiedenen Lokalpopulationen wird im Abschnitt 3.5 dargestellt.

Fazit: Die RAPD-Muster von DNA aus *O. nubilalis*-Proben mit und ohne Darm zeigten keine Unterschiede. Deshalb wurden Auswirkungen der Nichtziel-DNA (z. B. aus Bakterien, bzw. aus Mais) im Darm von *O. nubilalis* auf die RAPD-Muster als gering eingestuft. Eine spezielle Präparation der L5-Larven ist daher nicht notwendig.

3.2.2.3 Sonstige Nichtziel-DNA

Durch Bakterien-DNA in der Polymerase und durch Luft- und Wasserkontaminationen mit DNA kann es während der PCR zu Verunreinigungen mit Nichtziel-DNA kommen. Diese Kontaminationen wurden bei Negativ Kontrollen sichtbar, bei denen die PCR ohne Zugabe von Template-DNA ausgeführt wurde. Die Tabelle 23 zeigt die unterschiedlichsten Stärken von Nichtziel-DNA-Banden, die mit allen 20 Primern über zwei Jahre auftraten. Banden von gleicher Größe, die bei der Wasser-Probe und bei allen *O. nubilalis*-Standorten auftraten, blieben ohne Auswirkung auf den Wert der Distanzmatrix. Gleichgroße Banden, die in der Wasserprobe und bei einigen *O. nubilalis*-Herkünften auftraten, waren schwierig zu bewerten. Aufgrund des Überschusses der Ziel-DNA (ca. 2 ng/Reaktionsgemisch) sollte eine Amplifikation von Kopien der „sonstigen Nichtziel-DNA“ im RAPD-Muster nicht zu erkennen sein.

Die in den Negativ-Kontrollen amplifizierten Banden wurden hinsichtlich ihres Auftretens

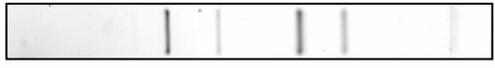
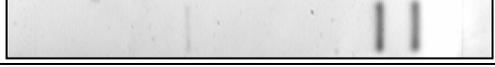
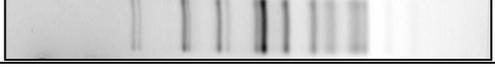
in den RAPD-Mustern der Ziel-DNA bewertet. Folgende Aussagen konnten auf der Grundlage der Tab. 23 getroffen werden:

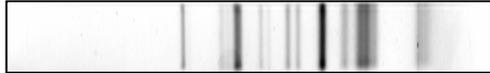
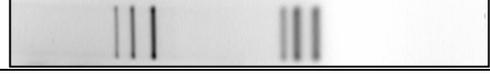
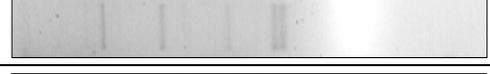
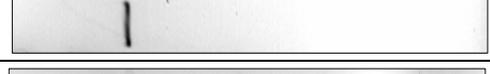
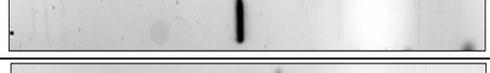
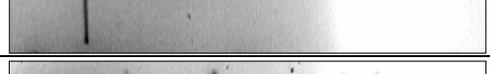
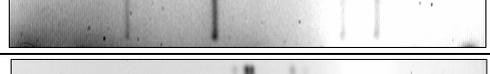
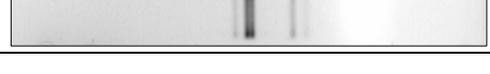
- Bei 15 Negativ-Kontrollen (OPA-05 in 2000, OPB-08 2000, OPF-03 2001, Roth 280-08 2001, Roth-A 02 2001, Roth-A 03 2000, Roth-A 09 2000, Roth-A 10 2000, Roth-A 12 2000, Roth-A 18 2000 und 2001, Roth-A 19 2000 und 2001 und Roth-A 20 2000 und 2001) sind keine Verunreinigungen, d. h. keine Banden festgestellt worden.
- PCR-Banden in den Negativ-Kontrollen des Primers Roth 280-08 aus dem Jahr 2000 und des Primers Roth-A 12 aus 2001 traten in den RAPD-Mustern von *O. nubilalis* nicht auf. Bei drei Wasser-Proben (OPA-07 Jahr 2000, OPF-03 Jahr 2000, Roth 180-08 Jahr 2000) waren jedoch alle in der Tabelle 23 dargestellten Varianten in den RAPD-Mustern aufgetreten.
- In 18 von 40 möglichen Wasserproben waren PCR-Banden vorhanden, die nicht bei *O. nubilalis* auftraten. PCR-Banden, die in der Wasserprobe und bei *O. nubilalis* amplifiziert wurden, traten in neun Proben auf. In 18 Proben sind PCR-Banden im Wasser und bei vielen *O. nubilalis*-Larven sichtbar geworden. Die in 11 Negativ-Kontrollen amplifizierten PCR-Banden traten bei allen *O. nubilalis*-Larven auf.
- Bei der Auswertung der Negativ-Kontrollen konnte keine Zuordnung zwischen der Anzahl der PCR-Banden und dem Polymorphiegrad der Primer nachgewiesen werden. Dies wird deutlich, wenn ein Vergleich zwischen den zwei polymorphen Primern Roth-A 20 und OPF-03 angestellt wird. Während der Primer OPF-03 in dem Jahr 2000 viele und amplifikationsstarke Banden in der Nichtziel-DNA hervorbrachte, wies der Primer Roth-A 20 in beiden Jahren keine einzige Verunreinigung auf. RAPD-Muster der Nichtziel-DNA von einem Primer aus zwei Jahren waren wenig übereinstimmend, was auf eine Zufälligkeit der Verunreinigung schließen lässt.
- Interessant waren die unterschiedlichen RAPD-Muster der Wasser-Proben zwischen den von MWG-Biotech AG und von Carl Roth GmbH bezogenen Primern (Tab. 23). Bei den MWG-Primern (Primer 1 bis 10) wurden in den Negativ-Kontrollen deutlich mehr PCR-Banden nachgewiesen und des Weiteren auch deutlich mehr Banden pro Negativ-Kontrolle amplifiziert als bei den Roth-

Primern. Daraus können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

1. Die unterschiedlichen Verunreinigungen zwischen den MWG- (Primer 1 bis 10) und Roth-Primern (Primer 10 – 20) waren möglicherweise auf eine unterschiedliche Verunreinigung bei der Primerherstellung zurückzuführen.
2. Da die Primer von zwei verschiedenen Firmen (MWG und Roth) bezogen wurden, ist nicht auszuschließen, dass die bestehenden Sequenzunterschiede oder Unterschiede im Herstellungsverfahren die Leistung der Primer beeinflussen.
3. Die von Operon entwickelten Primer-Sequenzen, die durch die MWG-Biotech AG hergestellt wurden, erfüllen die RAPD-spezifischen Anforderungen besser als die Roth-Sequenzen. Dadurch werden nicht nur viele Fragmente der Ziel-DNA, sondern auch ein großer Teil der Nichtziel-DNA, wie z. B. prokaryontische DNA, vervielfältigt. Dies kann allerdings bei geringen Mengen an Ziel-DNA gegenüber der Nichtziel-DNA die Auswertung der Ziel-DNA erschweren.

Tab. 23: Bewertung der Nichtziel-DNA-Banden im Vergleich zu den *O. nubilalis*-Banden (0 = nicht bei ECB; 1 = bei einem ECB; 2 bis n-1 = bei vielen; alle = bei allen ECB)

Primer	Jahr	Nichtziel-DNA-Banden nach PCR und elektrophoretischer Trennung	Vorkommen der Nichtziel-DNA-Banden in den <i>O. nubilalis</i> -Proben			
			0	1	2 bis n-1	alle
OPA-05	2001		x		x	
OPA-07	2000		x	x	x	x
	2001		x		x	
OPB-01	2000		x		x	x
	2001				x	
OPB-08	2001					x
OPC-15	2000			x		x
	2001		x	x	x	
OPC-18	2000		x		x	x

Primer	Jahr	Nichtziel-DNA-Banden nach PCR und elektrophoretischer Trennung	Vorkommen der Nichtziel-DNA-Banden in den <i>O. nubilalis</i> -Proben			
			0	1	2 bis n-1	alle
	2001		x	x		
OPD-11	2000		x		x	x
	2001		x		x	
OPF-03	2000		x	x	x	x
Roth 180-08	2000		x		x	x
	2001		x	x	x	x
Roth 280-08	2000		x			
Roth-A 02	2000					x
Roth-A 03	2001		x		x	x
Roth-A 09	2001		x		x	
Roth-A 10	2001				x	
Roth-A 11	2000				x	
	2001			x		
Roth-A 12	2001		x			
Roth-A 16	2000		x	x	x	
	2001		x	x	x	

Fazit: Während der PCR-Arbeiten konnten weitere unbeabsichtigte Verunreinigungen mit geringsten Mengen Nichtziel-DNA nicht ausgeschlossen werden. Sie wurden über eine stets mitlaufende Nullvariante identifiziert. Eine Beeinflussung der RAPD-Muster der Ziel-DNA war jedoch gering, da im Reaktionsansatz das Verhältnis von Ziel- zu Nichtziel-DNA deutlich zugunsten der *O. nubilalis*-DNA ausfiel.

3.2.3 Untersuchungen zur Zusammensetzung der Template-DNA

Für die Zusammenstellung einer Populationsprobe (sog. Template-DNA) standen prinzipiell drei Möglichkeiten zur Verfügung (Abb. 23):

1. Extraktion der DNA aus einzelnen Larven (Abschnitt 3.2.3.1)
2. Poolen der unter 1. gewonnenen Einzeltier-DNA-Extrakte zu einer Mischprobe (Abschnitt 3.2.3.2)
3. Extraktion der DNA von mehreren Larven gleichzeitig (Abschnitt 3.2.3.3)

In einer weiteren Versuchsserie wurde der Frage nachgegangen, ob bei der gemeinsamen Extraktion von DNA aus zufällig gesammelten Larven Geschwister und die Dauer einer Laborzucht die RAPD-Muster modifizieren können (Abschnitt 3.2.3.4).

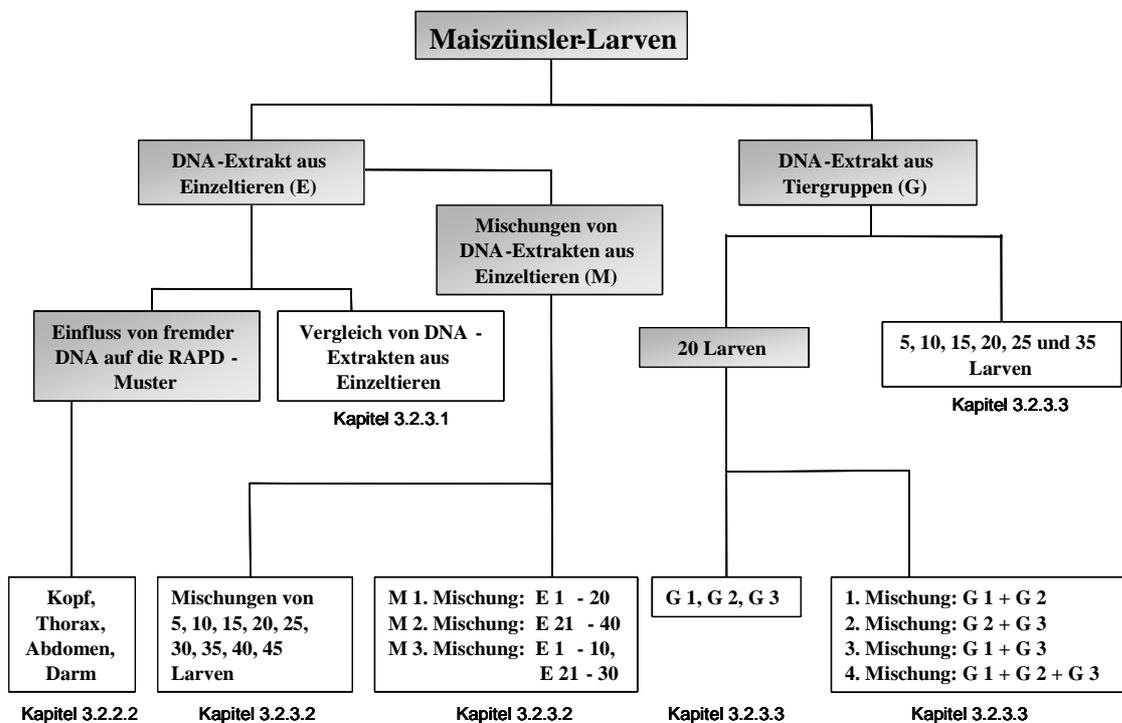


Abb. 23: Bestimmung der optimalen Template-DNA für die Hauptuntersuchungen zur genetischen Ähnlichkeit der ausgewählten Lokalpopulationen von *O. nubilalis*

Die hier durchgeführten PCR-Analysen basierten auf dem im Abschnitt 2.4.1 beschriebenen PCR-Protokoll und Thermocycler-Programm.

3.2.3.1 Einzeltier-DNA-Extrakte

Für die Untersuchungen mit Einzeltieren wurden von den Standorten Oderbruch, Halle, Hessisches Ried und Pocking aus dem jeweiligen Gesamtpool verfügbarer Larven von fünf

L5-Larven die DNA extrahiert. Die PCR erfolgte mit den Primern OPA-07, OPB-01, OPD-11, OPF-3 und Roth 180-08.

Die meisten Banden im RAPD-Muster waren bei allen Standorten und Primern individuen-spezifisch (Abb. 24). Artspezifische Banden, d. h. Banden, die bei allen 20 Einzeltieren auftraten, wurden nur in geringer Anzahl beobachtet (Abb. 24). Populationsspezifische Banden, d. h. Banden, die bei allen fünf Einzeltieren eines Standortes auftraten und bei anderen Standorten selten waren, wurden ebenfalls nur in geringer Anzahl beobachtet (Abb. 24). Artspezifische Banden entstanden bei den Primern OPA-07, OPB-01 und OPD-11; typische populationsspezifische Banden für die Standorte Oderbruch und Halle bei Primer OPA-07, Pocking und Oderbruch bei Primer OPB-01 und für den Standort Hessisches Ried bei Primer OPD-11 (Abb. 24). Die Primer OPF-03 und Roth 180-08 zeigten weder art- noch populationsspezifische Banden.

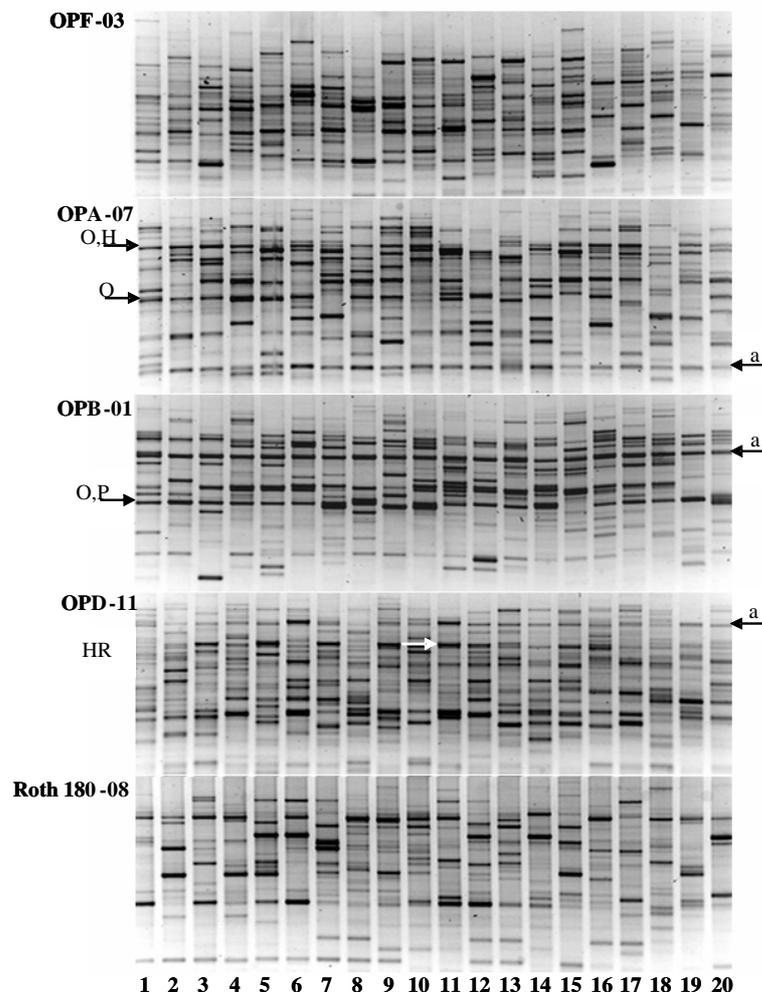


Abb. 24: RAPD-Muster der Primer OPF-03, OPA-07, OPB-01, OPD-11 und Roth 180-08 von fünf Einzeltieren des Maiszünslers *O. nubilalis* aus vier Standorten (**Spuren 1 – 5** = Einzeltiere aus dem Oderbruch, **6 – 10** = aus Halle, **11 – 15** = vom Hessischen Ried, **16 – 20** = aus Pocking; **a** = artspezifische Banden; **O** = Oderbruch, **H** = Halle, **HR** = Hessisches Ried, **P** = Pocking; O, H, HR, P = populationsspezifische Banden)

Für diese vier Standorte mit je fünf Einzeltieren wurde der Anteil gemeinsamer RAPD-Banden ermittelt und über alle Standorte ein Mittelwert gebildet. Dieser lag bei 46 %, d. h. im Umkehrschluss dass innerhalb einer Lokalspopulation (intrapopulationsspezifisch) ein durchschnittlicher genetischer Unterschied von 54 % existierte (Tab. 24). Zwischen den vier Lokalspopulationen (interpopulationsspezifisch) wurde nur eine genetische Ähnlichkeit von 34 % ermittelt.

Tab. 24: Anteil gemeinsamer RAPD-Banden (F) von jeweils fünf Einzeltieren pro *O. nubilalis*-Standort mit den Primern OPA-07, OPB-01, OPD-11, OPF-03 und Roth 180-08

F intrapop.	Oderbruch	Halle	Hessisches Ried	Pocking	Mittelwert
MW	0,45	0,49	0,50	0,41	0,46
± SD	0,26	0,27	0,25	0,25	0,04
F interpop.					0,34

MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; intrapop. = intrapopulationsspezifisch; interpop. = interpopulationsspezifisch; Berechnung von MW und SD im Anhang 8a

Neben den F-Werten wurden die H_s -Werte von allen Lokalspopulationen berechnet und daraus ergab sich ein Fixierungsindex von 0,212 (Tab. 25), d. h. das zwischen den Lokalspopulationen ein genetischer Unterschied von 21,2 % besteht und 78,8 % genetische Variation auf die Einzeltiere zurückzuführen sind. Damit ist zwischen den lokalen *O. nubilalis*-Populationen eine große genetische Differenzierung anzunehmen. Die daraus resultierende Mutationsrate von 0,929 gibt eine Migration von ca. einem Migranten pro Generation an.

Tab. 25: F-Statistik zwischen vier Lokalspopulationen von *O. nubilalis* (Einzeltier-DNA-Extrakte, fünf Primer)

Subpopulation	H_s	H_T, F_{ST}, Nm
Oderbruch	0,287	N = 5 L = 96 $H_T = 0,345 \pm 0,132$ $F_{ST} = 0,212$ Nm = 0,929
Halle	0,283	
HR	0,293	
Pocking	0,223	
MW ± SD	0,272 ± 0,032	

N = Anzahl der Einzelindividuen; L = (Loci) Zahl der polymorphen Banden; H_s = Heterozygotität einer Lokalspopulation; H_T = Heterozygotität der Art; F_{ST} = Fixierungsindex, Nm = Migration; MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Berechnung von MW und SD im Anhang 8b

Eine clusteranalytische Auswertung der einzelnen RAPD-Muster mit dem Programm MVSP führte zu keiner Zuordnung der Einzeltiere zu ihren Standorten (Abb. 25). Insbesondere die Larven aus dem Hessischen Ried sind innerhalb des Dendrogramms weit voneinander getrennt, am besten gelang die Gruppierung bei den Einzeltieren der Standorte Pocking und Oderbruch (Abb. 25).

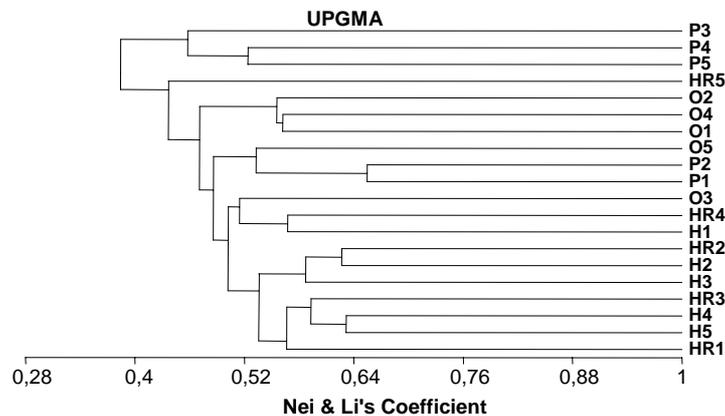


Abb. 25: MVSP-basierte Auswertung der RAPD-Muster (Nei & Li-Koeffizient) von fünf Einzeltieren des Maiszünslers *O. nubilalis* von jeweils vier verschiedenen deutschen Standorten mit den Primern OPA-07, OPB-01, OPD-11, OPF-03, und Roth 180-08 (O = Oderbruch; H = Halle; HR = Hessisches Ried; P = Pocking)

Fazit: Die RAPD-Muster der Einzeltiere waren unterschiedlich. Eine Zuordnung zu ihren Standorten war nicht möglich. Für die populationsgenetischen Untersuchungen wurde deshalb auf eine Template-DNA von Einzeltieren verzichtet und stattdessen DNA-Mischungen von mehreren Larven eingesetzt.

3.2.3.2 Poolen von Einzeltier-DNA-Extrakten

Die Untersuchungen berücksichtigten DNA-Extrakte aus 40 einzelnen L5-Larven (Proben 1 bis 40; eingestellt auf 1 ng DNA/ μ l) aus dem Gesamtpool an Larven vom Standort Oderbruch. Ausgehend von diesen 40 einzelnen DNA-Proben wurden Mischungen aus Probe 1 bis Probe 5, 1 - 10, 1 - 15, 1 - 20, 1 - 25, 1 - 30, 1 - 35 und 1 - 40 hergestellt und mit den Primern Roth 180-08 und OPA-07 RAPD-Muster erzeugt. Für den dritten Primer OPC-15 wurden weitere fünf Tiere (Proben 41 bis 45) hinzugenommen und weitere Mischungen aus Probe 45 – Probe 40, 45 - 35, 45 - 30, 45 - 25, 45 - 20, 45 - 15, 45 - 10, 45 - 5, 45 - 1 hergestellt und getestet. Alle Mischungen wurden in der PCR mit 2 ng/Reaktionsgemisch eingesetzt. Das bedeutet, dass mit zunehmender Anzahl von DNA-Proben im Gemisch die Anzahl der DNA-Kopien je Probe bzw. je Larve abnahm.

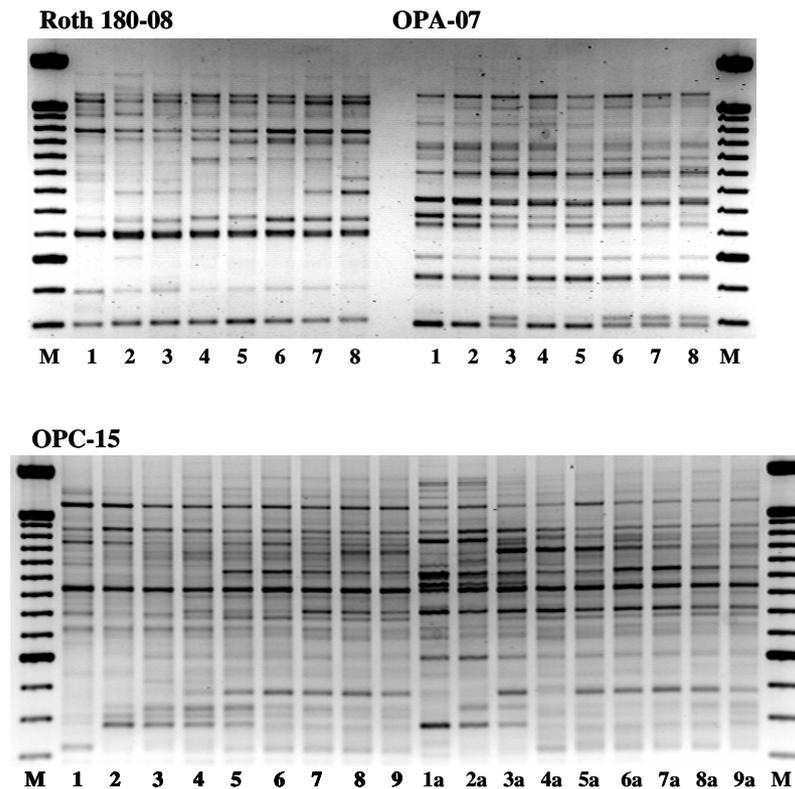


Abb. 26: RAPD-Muster der Primer Roth 180-08, OPA-07 und OPC-15 von verschiedenen Mischungen aus Einzeltier-DNA-Extrakten (**1** = Larven 1 – 5, **2** = 1 - 10, **3** = 1 - 15, **4** = 1 - 20, **5** = 1 - 25, **6** = 1 - 30, **7** = 1 - 35, **8** = 1 - 40, **9** = 1 – 45; **1a** = Larven 45 – 40, **2a** = 45 – 35, **3a** = 45 – 30, **4a** = 45 – 25, **5a** = 45 – 20, **6a** = 45 – 15, **7a** = 45 – 10, **8a** = 45 – 5, **9a** = 45 - 1; **M** = 100 bp-Marker)

Bei allen eingesetzten Primern und unabhängig von der Mischung wurde eine große Anzahl übereinstimmender Banden in den RAPD-Mustern beobachtet (Abb. 26). Zwischen einer zunehmenden Anzahl an Einzeltier-DNA-Extrakten in der Template-DNA und der Anzahl Banden im RAPD-Muster bestand kein direkter Zusammenhang; vielmehr kamen primerabhängig Banden hinzu oder gingen verloren oder identische Banden traten unterschiedlich stark auf. Bei allen drei Primern stellte sich erst bei einer DNA-Mischung von 20 bis 25 Larven nach der Extraktion eine Uniformität der RAPD-Muster ein. Ein Vergleich von Mischungen mit gleicher Anzahl an Larven, aber mit anderen Individuen, zeigte ebenfalls ab 20 bis 25 Larven pro Template-DNA übereinstimmende RAPD-Muster (Abb. 26, OPC-15 1a – 9a).

Da sich herausstellte, dass Mischungen von Einzeltier-DNA-Extrakten ab 20 bzw. 25 Larven konstante und gut reproduzierbare RAPD-Muster zeigen, wurde weiter hinterfragt, ob die Repräsentativität einer Probe für eine Lokalpopulation auch über mehrere 20er-Mischungen aus derselben Lokalpopulation erhalten bleibt. Hierfür wurden beispielhaft für

das Oderbruch drei Mischungen mit jeweils 20 Einzeltier-DNA-Extrakten mit den Primern OPA-07 und Roth180-08 untersucht. Folgende drei Mischungen wurden angesetzt: Mischung E1: Larven 1 bis 20, E2: 21 - 40, E3: 1 – 10 und 31 - 40. Die Ergebnisse zeigten, dass mit Primer OPA-07 für alle Mischungen einheitliche und mit Primer Roth 180-08 gering abweichende RAPD-Muster amplifiziert wurden (Abb. 27).

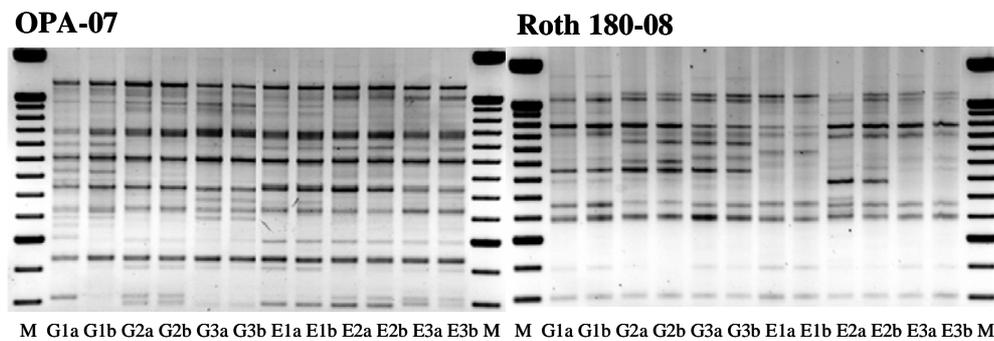


Abb. 27: RAPD-Muster der Primer OPA-07 und Roth 180-08 von Mischungen aus Einzeltier- und Tiergruppen-DNA-Extrakten (**G** = Gruppen, **E** = Einzeltiere; **1** = Larven 1 - 20, **2** = 21 - 40, **3** = 41 - 60; **a, b** = Wiederholungen; **M** = 100bp-Marker)

Fazit: Mit der Mischung von mehreren Einzeltier-DNA-Extrakten in einer Template-DNA konnten individualspezifische Banden zugunsten von art- und populationspezifischen Banden in den RAPD-Mustern verdrängt werden. Ab 20 Einzeltier-DNA-Extrakten pro Template-DNA traten konstante RAPD-Muster auf. Eine zufriedenstellende Reproduzierbarkeit der RAPD-Muster für eine Lokalpopulation war jedoch nicht gegeben.

3.2.3.3 Poolen von Einzeltieren vor der gemeinsamen DNA-Extraktion

Bei der Poolung von Einzeltieren aus dem Oderbruch vor ihrer gemeinsamen DNA-Extraktion wurde ebenfalls zunächst die Anzahl der *O. nubilalis*-Larven bestimmt, die als einheitlich extrahierte Gruppe die Lokalpopulation gut repräsentiert. Dazu sind DNA-Extrakte aus 5 bis 25 Larven (fünf Gruppen G1 - G5 mit insgesamt 75 Larven) hergestellt worden; zusätzlich wurde ein weiterer Extrakt aus 10 Larven zu dem Extrakt aus 25 Larven zugeführt, so dass ein Extrakt aus 35 Larven entstand (G6). Alle Proben wurden mit dem Primer OPC-15 untersucht.

Die Ergebnisse zeigten, dass bei der Extraktion von mindestens 20 Larven reproduzierbare populationspezifische und/oder artspezifische RAPD-Muster entstanden (Abb. 28). Die Unsicherheit, ob populations- oder artspezifisch ergab sich aus dem Umstand, dass der

aufwendige Test nur mit der Lokalpopulation aus dem Oderbruch durchgeführt werden konnte.

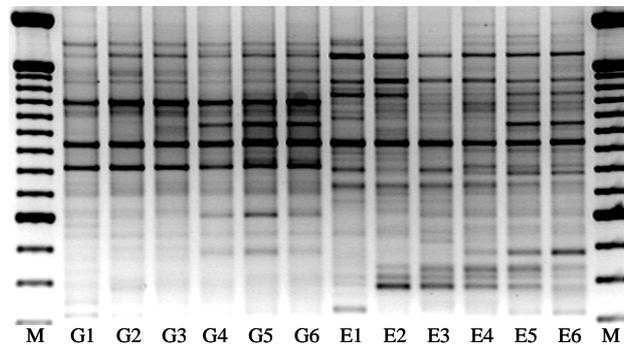


Abb. 28: RAPD-Muster des Primers OPC-15 von DNA-Extrakten aus Tiergruppen (**G**) und Mischungen von DNA-Extrakten aus Einzeltieren (**E**) (**1** = Larven 1 - 5, **2** = 1 - 10, **3** = 1 - 15, **4** = 1 - 20, **5** = 1 - 25, **G6** = 1 - 35, **E6** = 1 - 30; **M** = 100bp-Marker)

Für den Vergleich der DNA-Extrakte aus Tiergruppen mit den Mischungen der DNA-Extrakte aus Einzeltieren (E1 bis E3) (Abschnitt 3.2.3.2) wurden drei Gruppen von je 20 Tieren und damit 60 Einzeltiere verwendet (Abb. 27). In dieser Untersuchung (Einzel- und Tiergruppen) wurden insgesamt 60 *O. nubilalis*-Larven aus dem Oderbruch untersucht.

Der Vergleich hat gezeigt, dass sowohl Mischungen von DNA-Extrakten aus Tiergruppen als auch aus Einzeltieren keine vollständig übereinstimmenden RAPD-Muster lieferten (Abb. 28). Es gab nicht nur erwartete Unterschiede im RAPD-Muster zwischen den gemischten Extrakten aus Tiergruppen und Einzeltieren, sondern auch innerhalb dieser Gruppen. Diese Unterschiede im RAPD-Muster waren jedoch primerabhängig: Primer OPA-07 führt bei allen sechs Mischungen zu einheitlichen RAPD-Mustern; Primer Roth 180-08 manifestierte Unterschiede zwischen allen Mischungen, wobei diese zwischen den Mischungen der Einzeltier-Extrakte (E1, E2, E3) deutlich stärker hervortraten als zwischen den Mischungen der Tiergruppen-Extrakte (G1, G2, G3).

Aus dem Vergleich der beiden prinzipiellen Möglichkeiten zur Herstellung einer repräsentativen Template-DNA für eine Lokalpopulation geht hervor, dass bei Verwendung von Primern, die stärker die polymorphen Banden in den RAPD-Mustern betonen, konstante populationsspezifische Muster bei Extrakten aus Tiergruppen ab 20 Larven schneller erreicht werden als bei Mischungen aus Einzeltier-Extrakten.

Schließlich wurde in einem weiteren Test mit den Primern Roth 180-08 und OPA-07 hinterfragt, ob eine Mischung von zwei bis drei Extrakten aus je 20 Tieren die Übereinstimmung der RAPD-Muster weiter stabilisiert. Bei allen drei 40er-Mischungen

und der 60er-Mischung zeigte sich eine ausgeprägte Uniformität in den RAPD-Mustern (Abb. 29). Die noch bestehenden geringen Unterschiede zwischen den drei 20er-Mischungen wurden aufgehoben.

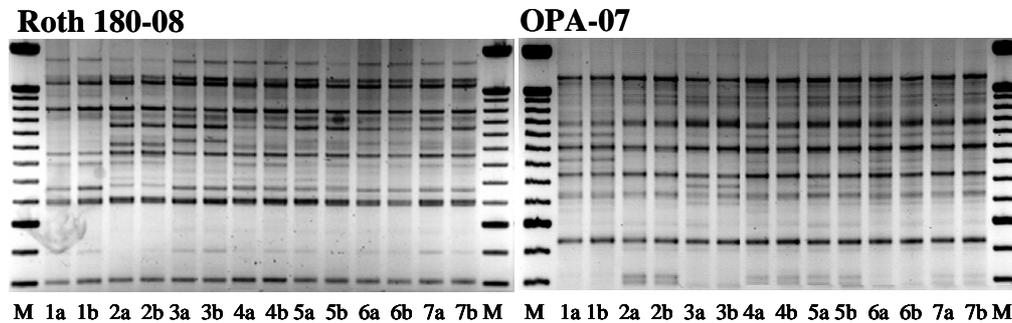


Abb. 29: RAPD-Muster der Primer Roth 180-08 und OPA-07 von verschiedenen Mischungen aus DNA-Extrakten von Tiergruppen (20 Tiere) (**1 – 3** = je ein Extrakt, **4 – 6** = Mischungen aus 2 Extrakten, **7** = aus drei Extrakten; **a, b** = Wiederholungen; **M** = 100bp-Marker)

Der Vergleich der RAPD-Muster von DNA aus Tiergruppen mit der DNA aus Einzeltieren hat gezeigt, dass mit zunehmender Anzahl individueller DNA im Template das Hintergrundrauschen in den RAPD-Mustern primerabhängig zunahm und damit Schwierigkeiten bei der Auswertung der Muster zu befürchten waren. Daher musste ein Kompromiss zwischen der Repräsentativität der Template-DNA für die Lokalpopulation einerseits und der Praktikabilität der PCR, inkl. der visuellen Auswertung, andererseits gefunden werden. Dieser Kompromiss lag schließlich bei DNA-Extrakten aus 20 Larven pro Lokalpopulation.

Fazit: Die technisch günstigere Variante zur Erzielung reproduzierbarer RAPD-Muster der Template-DNA führte über eine Mischung von 20 Larven aus dem Feld vor der Extraktion. Dieses Verfahren wird deshalb für Untersuchungen zur genetischen Variabilität von Lokalpopulationen in Verbindung mit mindestens 15 Dekamerprimern empfohlen.

3.2.3.4 Geschwisterlarven

Bei der Berücksichtigung von 20 Larven für eine Template-DNA kann bei geringem Befall nicht ausgeschlossen werden, dass sich unter den gesammelten Larven auch Geschwister befinden. Damit könnte die Repräsentativität der Template-DNA für die Lokalpopulation beeinträchtigt werden, da bei Larven von gleichen Eltern ähnlichere RAPD-Muster zu erwarten sind als bei nicht verwandten Tieren. Werden allerdings die 20 Larven aus einem Pool von Tieren genommen, die zuvor von einem großen Feld gesammelt wurden, dann

sollte die zufällige Auswahl von Geschwisterlarven in der Probe eher unwahrscheinlich sein. Anders liegt jedoch die Situation, wenn die 20 Larven aus einer einjährigen Zucht oder aus einer Dauerzucht ausgewählt werden, da hier die Grundgesamtheit der Lokalpopulation deutlich unter der des Freilandes liegt bzw. langjährige Inzucht- und Selektionseffekte auftreten können. Für diese Untersuchungen wurden jeweils zwei bis drei Geschwistergruppen isoliert und ihre L5-Larven zu folgenden Proben zusammengestellt:

- Probe A: Labortiere der F1-Generation aus dem Oderbruch (Feld);
- Probe B: Labortiere der F3-Generation aus dem Oderbruch (einjährige Zucht);
- Probe C: Labortiere der F20- bis 30-Generation aus Darmstadt (Dauerzucht) und
- Probe D: Larven aus einem Maisstängel vom Feld aus dem Oderbruch.

Bei jeder Probe wurden von zwei bzw. drei Geschwistergruppen jeweils fünf Larven separat extrahiert und mit den Primern OPC-15 und OPF-03 die RAPD-Muster hergestellt. Die Ergebnisse wurden verifiziert über einen Test mit Larven, die in nur einem Maisstängel auf einem Feld im Oderbruch gefunden wurden (Probe D). Es ist davon auszugehen, dass es sich bei Larven aus einem Stängel eher um Geschwister handelt als bei Larven aus verschiedenen Stängeln. Von den Proben A, B und C wurden sowohl die RAPD-Muster der fünf Einzeltiere innerhalb einer Geschwistergruppe als auch die RAPD-Muster zwischen den Geschwistergruppen verglichen. Hierfür wurde der Anteil gemeinsamer RAPD-Banden in den zu vergleichenden RAPD-Mustern der Einzeltiere ermittelt und daraus der Mittelwert berechnet, d. h. bei einem Mittelwert von 1 würden alle amplifizierte Banden bei allen Einzeltieren auftreten. Aufgrund des geringen Stichprobenumfangs musste auf eine statistische Absicherung verzichtet werden.

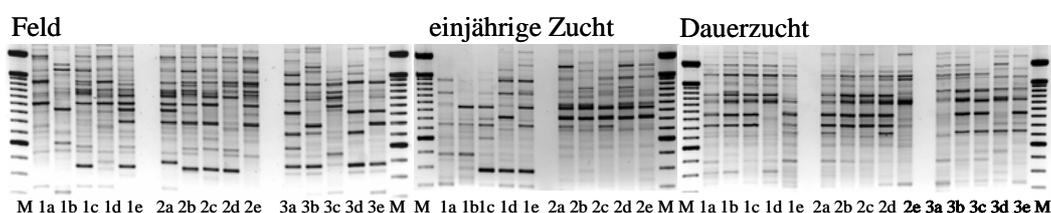
Die RAPD-Muster der Geschwister in den jeweiligen Proben brachten primerunabhängig größere Gemeinsamkeiten (Anzahl identischer Banden) gegenüber den Ergebnissen mit nicht verwandten Einzeltieren hervor (Abschnitt 3.2.3.1). Es zeigte sich, dass bei der Probe A die Variabilität der RAPD-Muster innerhalb und zwischen den drei Geschwistergruppen etwas stärker war als bei der Probe B mit zwei Geschwistergruppen, aber deutlich höher als bei Probe C mit ebenfalls drei Geschwistergruppen (Tab. 26).

Tab. 26: Anteil gemeinsamer RAPD-Banden (F) von fünf Einzeltieren pro Geschwistergruppe (Primer OPC-15 und OPF-03)

F	Probe A				Probe B			Probe C			
	G 1	G 2	G 3	G 1-3	G 1	G 2	G 1-3	G 1	G 2	G 3	G 1-3
MW	0,52	0,69	0,51	0,57	0,59	0,64	0,62	0,78	0,75	0,71	0,75
± SD	0,27	0,27	0,25	0,07	0,31	0,30	0,03	0,25	0,28	0,25	0,02

MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; G = Gruppe; Berechnung von MW und SD im Anhang 8c

OPC-15



OPF-03

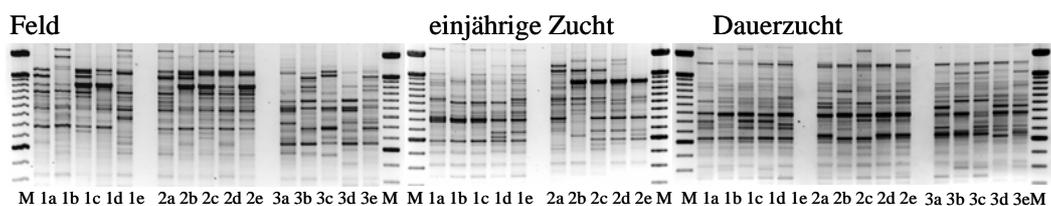


Abb. 30: RAPD-Muster der Primer OPC-15 und OPF-03 von Geschwistern der F1 aus dem Feld, aus der F2 bis F3 einer einjährigen Zucht und aus einer Dauerzucht (**1, 2, 3** = verschiedene Geschwisterpaare; **a – e** = verschiedene Larven; **M** = 100bp-Marker)

Die größere genetische Ähnlichkeit zwischen Geschwistern aus einer Dauerzucht (Probe C) kann darauf hinweisen, dass suboptimale Umweltbedingungen, das Ausbleiben der Diapause, Inzucht und andere Selektionseinflüsse die genetische Variabilität verringern. Damit sind Larven aus einer längeren Laborzucht nicht mehr repräsentativ für das genetische Herkunftsgebiet, während eine kurze Haltung unter Laborbedingungen die Repräsentativität nicht beeinträchtigt.

Die Verifizierung der Ergebnisse mit „möglichen Geschwistern aus dem Freiland“ (Probe D) hat gezeigt, dass Larven aus dem gleichen Stängel vermutlich keine Geschwister sind. Die jeweiligen RAPD-Muster zeigten mit 0,48 von allen Proben die geringsten Mittelwerte für die genetische Ähnlichkeit (Tab. 27a). Hierbei ist zu beachten, dass bei einer geringen Anzahl von Larven der Anteil gemeinsamer RAPD-Banden höher bewertet wird als bei einer größeren Anzahl an Larven. Daher wurde für einen verbesserten Vergleich zwischen

den Proben A und D bei der Probe A nur die ersten drei und die letzten drei von fünf Vollgeschwistern für die Auswertung berücksichtigt (Tab. 27b). Durch diese Modifikation stieg die genetische Ähnlichkeit bei beiden Proben von 0,57 auf 0,63 an. Die beiden zusätzlichen Larven, die eine Art Außengruppe darstellten, zeigten ähnlich starke Unterschiede in den RAPD-Mustern wie die Larven aus der Probe D (Abb. 31).

Tab. 27: a) Anteil gemeinsamer RAPD-Banden (F) von drei Einzeltieren pro Stängel (Primer OPC-15 und OPF-03); b) zur besseren Bewertung der MW von a) – Anteil gemeinsamer RAPD-Banden (F) von jeweils drei Geschwister-Larven aus dem Feld anhand der gleichen Primern

a)

F	Probe D		
	1. Stängel n = 3 Larven	2. Stängel n = 3 Larven	Mittelwert vom 1. und 2. Stängel
MW	0,48	0,47	0,48
± SD	0,22	0,19	0,01

b)

F	ersten drei von insgesamt fünf Larven				letzten drei von insgesamt fünf Larven			
	1. G	2. G	3. G	1. – 3. G	1. G	2. G	3. G	1. – 3. G
MW	0,58	0,72	0,59	0,63	0,61	0,74	0,55	0,63
± SD	0,29	0,27	0,27	0,08	0,25	0,27	0,24	0,10

MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; G = Gruppe; Berechnung von MW und SD im Anhang 8d

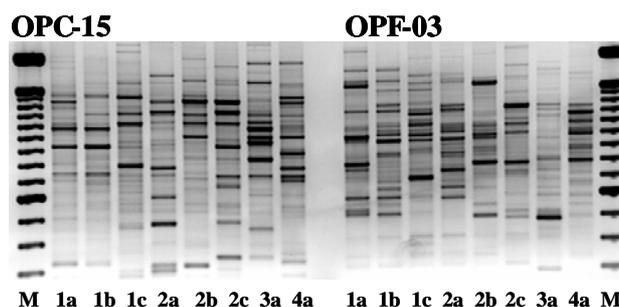


Abb. 31: RAPD-Muster der Primer OPC-15 und OPF-03 von Larven aus jeweils einem Maisstängel = Probe D (1 - 4 = verschiedene Stängel; a - c = unterschiedliche Larven; M = 100bp-Marker)

Fazit: RAPD-Muster von einzelnen Geschwisterlarven zeigten eine größere Anzahl übereinstimmender Banden als die Muster von einzelnen Nichtgeschwistern, insbesondere dann, wenn die Larven aus einer Laborzucht stammten. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass bei einem zufällig geringen Anteil von Geschwisterlarven in

einer 20er-Mischprobe vom Feld geschwisterspezifische Banden ebenso in den Hintergrund treten wie individualspezifische gegenüber den populations- und artspezifischen Banden.

3.2.3.5 Größe und Abstand der Sammelgebiete

Die repräsentative Probenentnahme von 20 Larven ist ein entscheidendes Kriterium, um eine Lokalpopulation sicher charakterisieren und mit anderen Lokalpopulationen vergleichen zu können. Daher wurde in einem gesonderten Versuch den Fragen nach der minimalen Feldgröße und der Auswahl des Feldbereiches nachgegangen. Dazu sind im Jahre 2001 in Gusow (Oderbruch) auf einer Fläche von 2,2 ha fünf verschiedene Parzellen mit einer Größe von 187 m² bis 319 m² abgesteckt worden, aus denen nach der Zusammenführung aller Larven pro Parzelle jeweils 20 *O. nubilalis*-Larven in die molekulargenetischen Untersuchungen gingen (Abb. 32 A). Die vier Eckpunkte der Parzellen und die Eckpunkte des gesamten Feldes wurden mit Hilfe des GPS-Gerätes Leica GS 50 aufgenommen. Ein ähnlicher Versuch wurde auch in Spickendorf (Halle) auf einer Fläche von ca. 2 ha durchgeführt, indem vier benachbarte Parzellen nach dem gleichen Verfahren wie im Oderbruch beprobt wurden (Abb. 32 B). Auf eine genaue Berechnung der Teilflächen in Spickendorf mit Hilfe des GPS-Gerätes wurde verzichtet. Jede Teilfläche hatte eine Größe von etwa 200 m².

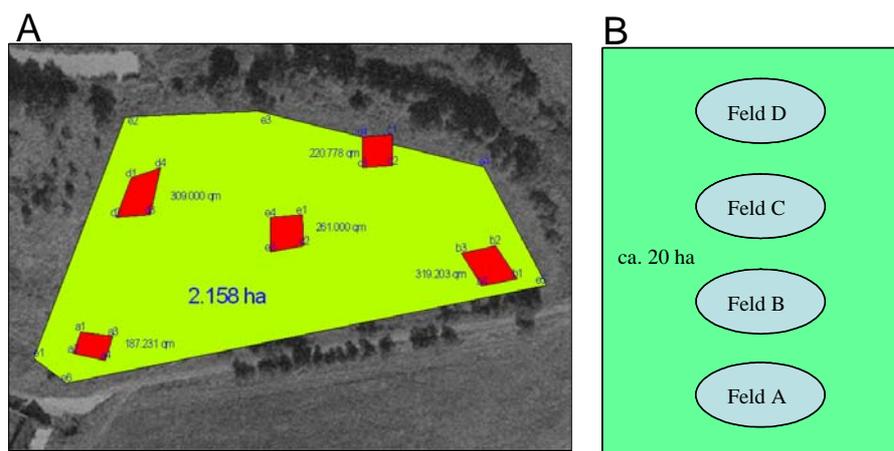


Abb. 32: Darstellung der Feldbeprobung in Gusow (Oderbruch) und Spickendorf (Halle) (A = Luftbildaufnahme von Gusow, B = schematische Darstellung von Spickendorf)

Bei der Wahl der Probenentnahme von den Teilflächen wurden folgende Varianten ausgewählt:

- Variante 1: Larven aus einer kleinen Teilfläche „E“ (e1 - e4) von ca. 260 m² aus Gusow;
- Variante 2: Larven aus mehreren kleinen Teilflächen „A“ (a1 – a4) bis „E“ (e1 – e4) des gesamten Feldes aus Gusow bzw. „A“ – „D“ aus Spickendorf;
- Variante 3: Vergleich der Proben von den Teilflächen mit den Proben vom ganzen Feld „G“ aus Gusow (Feld A bis E) und Spickendorf (Feld A bis D).

In Variante 1 wurde geprüft, ob Unterschiede in den RAPD-Mustern zwischen drei Template-DNA-Extrakten aus je 20 Larven auf einer Teilfläche von ca. 260 m² existierten. In der PCR wurden die polymorphen Primer OPD-11, OPC-15 und OPF-03, die eine hohe Anzahl an Banden amplifizierten, ausgewählt (Abb. 33). Um eine Aussage über die Ähnlichkeit der genetischen Muster zwischen den Teilflächen zu treffen, ist vergleichbar mit der Auswertung zwischen den Geschwistern (Kapitel 3.2.3.4) über alle Varianten der Anteil gemeinsamer RAPD-Banden ermittelt worden. Zwischen den drei Proben der Teilfläche „E“ bestanden bei allen drei Primern wenige Unterschiede in den RAPD-Mustern. Mit 76 % erreichten die DNA-Extrakte des Feldstücks „E“ einen hohen Wert für die Bandenübereinstimmung (Tab. 28).

In der Variante 2 wurden DNA-Extrakte der 20-Tiergruppen von vier (Spickendorf) bzw. fünf Teilflächen (Gusow) für die Analyse zur Berechnung der genetischen Ähnlichkeiten herangezogen. Diese PCR-Untersuchungen sind mit den gleichen Primern wie bei Variante 1 durchgeführt worden.

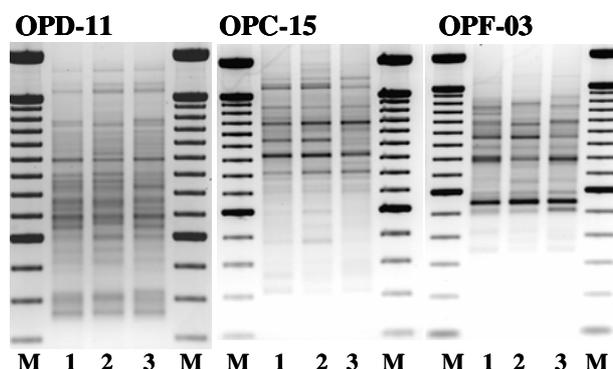


Abb. 33: RAPD-Muster der Primer OPD-11, OPC-15 und OPF-03 von drei verschiedenen 20er-Tiergruppen vom Standort Gusow (Oderbruch), Teilfläche E (1 – 3 = unterschiedliche 20-Tier-Proben; M = 100bp-Marker)

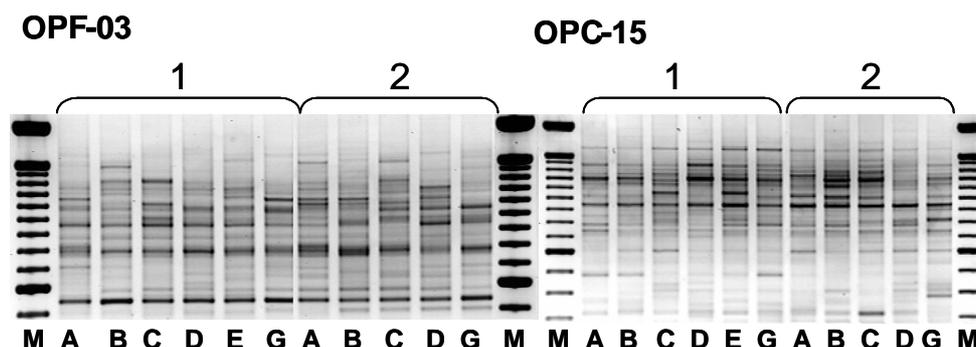


Abb. 34: RAPD-Muster der Primer OPF-03 und OPC-15 von Teilpopulationen der einzelnen Feldflächen und der Gesamtfläche eines Feldes an den Standorten Oderbruch und Halle (1 = Oderbruch, 2 = Halle; A – E = unterschiedlichen Teilflächen, G = Gesamtfläche; M = 100bp-Marker)

Tab. 28: Anteil gemeinsamer RAPD-Banden (F) der 20er-Tiergruppen-DNA-Extrakte von verschiedenen Teilflächen der Standorte Oderbruch und Halle (Primer OPD-11, OPC-15 und OPF-03)

F	Gusow (Oderbruch)			Spickendorf (Halle)	
	„E“	„A“ bis „E“	„A“ bis „G“	„A“ bis „D“	„A“ bis „G“
Anzahl Banden	33	52	52	33	34
MW	0,76	0,61	0,62	0,64	0,59
± SD	0,27	0,34	0,33	0,29	0,28

MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Teilflächen A - E = mit GPS bestimmten Eckpunkte der Teilflächen (a1 - e4); Berechnung von MW und SD im Anhang 8e

Die RAPD-Muster von 20 Tiergruppen der Teilflächen „A“ bis „E“ bzw. „A“ bis „D“ zeigten untereinander eine höhere genetische Variabilität als die RAPD-Muster innerhalb der Teilfläche „E“ (Tab. 28, Abb. 34). Des Weiteren wurde eine Clusteranalyse von den DNA-Extrakten der verschiedenen Teilflächen aus Gusow und Spickendorf erstellt, bei der zusätzlich der überwiegend monomorphe Primer OPB-01 hinzugenommen wurde (Abb. 35). Dadurch zeigten sich im Dendrogramm höhere Ähnlichkeiten im RAPD-Muster im Vergleich zu der Auswertung mit nur drei polymorphen Primern. Die am weitesten innen befindlichen Feldstücke „D“ und „E“ des Standortes Oderbruch wiesen die größte Übereinstimmung auf und charakterisieren durch die enge Gruppierung zu „G“ das Gesamtfeld am besten. Die Teilflächen „A“ und „B“, die sich beide am Feldweg befanden, bildeten mit der Teilfläche „C“, das in der Nähe eines Baumgürtels lag, genetisch ähnliche Gruppen. Auch die DNA-Extrakte von benachbarten Teilflächen aus Spickendorf zeigten eine höhere genetische Übereinstimmung als zwischen den weiter entfernten Teilflächen. Die zwei Teilflächen „A“ und „B“, die sich beide in der Nähe des Feldwegs befanden, bildeten die engste Gruppierung, von der sich wiederum die Teilfläche „C“ abgliederte.

Die Teilfläche „D“, die an eine Straße angrenzte, wich von den anderen Teilflächen stark ab, charakterisierte aber wiederum das Gesamtfeld „G“ am besten (Abb. 35).

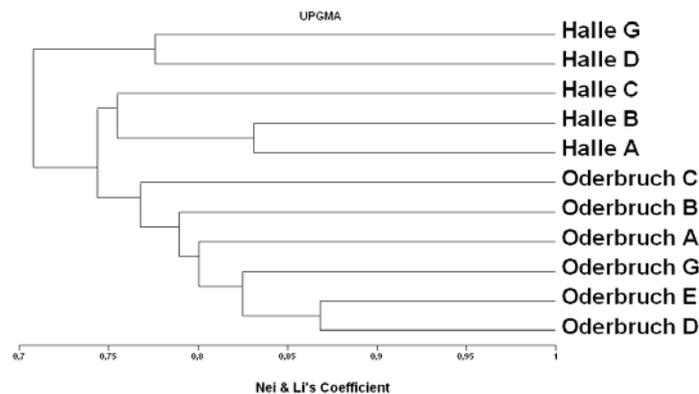


Abb. 35: MVSP-basierte Auswertung der RAPD-Muster (Nei & Li-Koeffizient) von den Teilflächen- (A - E) und Gesamtfächenpopulationen (G) der Standorte Oderbruch und Halle aus dem Jahr 2001 mit den Primern OPC-15, OPD-11, OPF-03 und OPB-01

In der Variante 3 wurde schließlich untersucht, ob Unterschiede im RAPD-Muster zwischen den DNA-Extrakten vom gesamten Feld zu den verschiedenen Teilflächen existierten. Für diesen Vergleich wurden zweimal von jeder Teilfläche jeweils vier Larven entnommen, vor der Extraktion gepoolt und mit dieser 20er-Mischprobe (G1, G2) eine RAPD-PCR mit den zwei polymorphen Primern OPC-15 und OPF-03 durchgeführt (Abb. 36).

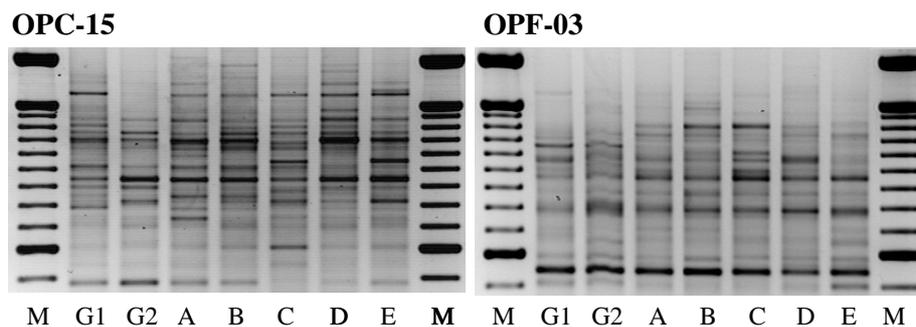


Abb. 36: RAPD-Muster der Primer OPC-15 und OPF-03 von DNA-Extrakten aus 20 Tier-Proben aus zwei Gesamtfächen (G1, G2) bzw. fünf Teilflächen (A – E) (M = 100bp-Marker)

Die RAPD-Muster der beiden DNA-Extrakte von der Gesamtfäche (G1, G2) zeigten eine genetische Ähnlichkeit von 87 % (Tab. 29). Eine geringere genetische Ähnlichkeit von 57 % wurde zwischen den DNA-Extrakten der fünf Teilflächen erzielt (Tab. 29). Der geringere F-Wert der Teilflächen „A“ bis „E“ in Tab. 29 im Vergleich zur Tab. 28 ergibt

sich durch eine neue Berechnung des F-Wertes bei der Einbeziehung der Gesamtflächen (G1, G2).

Tab. 29: Anteil gemeinsamer RAPD-Banden (F) von zwei Gesamtflächen (G1, G2) und Teilflächen (A - E) des Standortes Gusow (Oderbruch) (Primer OPC-15 und OPF-03)

F	G1 + G2	„A“ bis „E“
Anzahl Banden	19	32
MW	0,87	0,57
± SD	0,23	0,31

MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; Berechnung von MW und SD im Anhang 8f

Für den Standort Spickendorf wurde nur ein DNA-Extrakt der Gesamtfläche als Vergleich zu den DNA-Extrakten der Teilflächen herangezogen.

Die DNA-Extrakte von den Teilflächen und jeweils ein DNA-Extrakt des gesamten Feldes von beiden Standorten wurden für die Erstellung des Dendrogramms ausgewertet. Die Clusteranalyse spiegelt einerseits die Standortcharakteristik wieder, zeigt aber auch andererseits, dass zwischen den beiden Standorten Oderbruch und Halle eine hohe genetische Ähnlichkeit besteht (Abb. 35). Die Proben aus Gusow gruppieren sich stärker zusammen als die Proben aus Spickendorf.

Der DNA-Extrakt der Gesamtfläche vom Standort Oderbruch, der sich aus den Larven der DNA-Extrakte von den Teilflächen zusammensetzte, wird am besten durch die mittleren Teilflächen „D“ und „E“ gegenüber den Randflächen „A“ und „B“ charakterisiert. Durch die detaillierte Betrachtung der Ähnlichkeitskoeffizienten der einzelnen Teilflächen nach NEI & LI (1979) wird jedoch deutlich, dass das Gesamtfeld am besten durch die mittlere Teilfläche „E“ beschrieben wird (Tab. 30). Diese Teilfläche „E“ hat zur Gesamtfläche den höchsten Ähnlichkeitskoeffizienten von 0,84. Da aus Zeitgründen nur ein DNA-Extrakt von jeder Teilfläche untersucht wurde, bestand keine Möglichkeit die Koeffizienten einem statistischen Verfahren zu unterziehen.

Tab. 30: Ähnlichkeitskoeffizienten zwischen den einzelnen Teilflächen und in Beziehung zum Gesamtfeld Gusow (Oderbruch) (Primer OPC-15 und OPF-03)

Teilfläche	A	B	C	D	E	G1
A	1,00					
B	0,78	1,00				
C	0,70	0,77	1,00			
D	0,81	0,83	0,84	1,00		
E	0,80	0,75	0,79	0,87	1,00	
G1	0,79	0,80	0,73	0,81	0,84	1,00

A = (a1 - a4), B = (b1 - b4), C = (c1 - c4), D = (d1 - d4), E = (e1 - e4); G1 = A - E; a1 - e4 = mit GPS bestimmte Eckpunkte der Teilflächen

Fazit: Beim Vergleich von Teilflächen eines 2 ha großen Feldes stimmte die Teilfläche in der Mitte des Feldes am besten mit den RAPD-Mustern des gesamten Feldes überein. Durch Mischungen von DNA-Extrakten der Teilflächen wurden die Unterschiede zwischen den Teilflächen eliminiert und ähnliche RAPD-Muster erzeugt. Für eine repräsentative Probenentnahme wird empfohlen, jeweils fünf Larven aus vier verschiedenen Teilflächen im Kernbereich eines Feldes mit einer Gesamtfeldgröße von mindestens 2 ha zu einer Mischprobe von 20 Larven zu vereinigen.

3.3 Auswertung der RAPD-Muster für die Bewertung der genetischen Ähnlichkeit von lokalen *O. nubilalis*-Populationen der Z-Rasse

Eine Population beschreibt die Gesamtheit der Individuen einer Art in einem überwiegend von anderen Artangehörigen isolierten Gebiet (reproduktive Isolation). Durch die Ausbreitung von *O. nubilalis* (Migration) zwischen nicht vollständig isolierten Populationen erfolgt ein Austausch von Erbfaktoren, der so genannte Genfluss. Dieser Genfluss kann über die genetische Ähnlichkeit der *O. nubilalis*-DNA in Form von RAPD-Mustern abgeschätzt werden. Des Weiteren können durch die RAPD-Muster auch ähnliche Selektionsbedingungen, wie klimatische, topographische oder anbautechnische Faktoren, aufgezeigt werden. Zunächst war es das Ziel, durch die RAPD-PCR die genetischen Ähnlichkeiten in Form von Clusteranalysen aus allen detektierten Banden für artspezifische, rassenspezifische und populationspezifische Merkmale darzustellen (quantitativer Ansatz). Für den artspezifischen Vergleich wurden neben *O. nubilalis* die beiden Arten *Plodia interpunctella* und *Ephestia kuehniella* herangezogen. Die rassenspezifische Differenzierung erfolgte zwischen der Lokalpopulation Bonn (E-Rasse) und zehn Lokalpopulationen der Z-Rasse. Besonderes Augenmerk wurde auf die Erstellung einer Status-quo-Analyse von lokalen Z-Populationen vor der Einführung des

Bt-Mais gerichtet. Auf der Grundlage dieser Status-quo-Analyse könnten in einigen Jahren nach dem Anbau von *Bt*-Mais DNA-Marker für sich entwickelnde *Bt*-Resistenz-Gene detektiert werden, die als Resistenzmarker dienen können. Weiterhin wurden einzelne charakteristische RAPD-Banden, so genannte Markerbanden, zur Populationsidentifizierung und –differenzierung herangezogen (qualitativer Ansatz).

Die von der Kandidatin vorgenommene Auswertung der RAPD-Muster (Auswertung 1) wurde von einer zweiten Person wiederholt (Auswertung 2), um subjektive Einflüsse bei der Zuordnung von einzelnen Banden zu berücksichtigen. Die Berechnung der genetischen Distanzen wurde nach Erstellung der 0/1-Matrix (Exceltabellen) mit Hilfe des Programms MVSP vorgenommen.

Für die Bewertung der MVSP-Ergebnisse wurden Bootstrapwerte unter SIMSTAT v. 2.07 für Windows ermittelt, die mit jeweils 100 Pseudostichproben durchgeführt wurden. Ab einem Bootstrapwert von 60 % wird von einer hohen Absicherung ausgegangen (Darstellung in Schriftschnitt fett). Die Bootstrapwerte von 50 % bis 60 % zeigen nur eine Tendenz der genetischen Ähnlichkeit und wurden daher in allen Dendrogrammen nicht mit dem Schriftschnitt „fett“ dargestellt. Da Bootstrapwerte von 50 % - 60 % nicht abgesichert werden können, wurde auf ihre Angabe verzichtet. Des Weiteren wurde unter SAS ein Permutationstest durchgeführt, der die genetische Eigenständigkeit von Lokalpopulationen überprüfen sollte.

3.3.1 Vergleich von lokalen *O. nubilalis*-Populationen der Z-Rasse mit zwei Arten aus anderen Gattungen der Familie Pyralidae sowie mit einer Mischung aus E- und Z-Rasse

Im Material- und Methodenteil sind die Außengruppen *Plodia interpunctella* und *Ephestia kuehniella* vorgestellt worden, die in den Jahren 2000 und 2001 mit in die PCR-Untersuchungen eingingen. Das Ziel des Einsatzes dieser Außengruppen bestand in der Überprüfung der RAPD-Methode. Es sollte eine sichere Erkennung der Maiszünsler-Art gegenüber anderen Arten der gleichen Familie Pyralidae aufgezeigt werden. Des Weiteren wurde bei der Lokalpopulation Bonn eine gleichmäßige Mischung von Larven aus der E- und Z-Rasse hergestellt, um den Einfluss der E-Rasse auf die Muster der Z-Rasse darzustellen. Die Auswertung der Dendrogramme mit den Außengruppen erfolgte nur von der Kandidatin. Die Auswertung der RAPD-Muster bei Hinzunahme eines DNA-Extraktes

der E-Rasse zu einem DNA-Extrakt der Z-Rasse wurde jedoch von einer zweiten Person wiederholt.

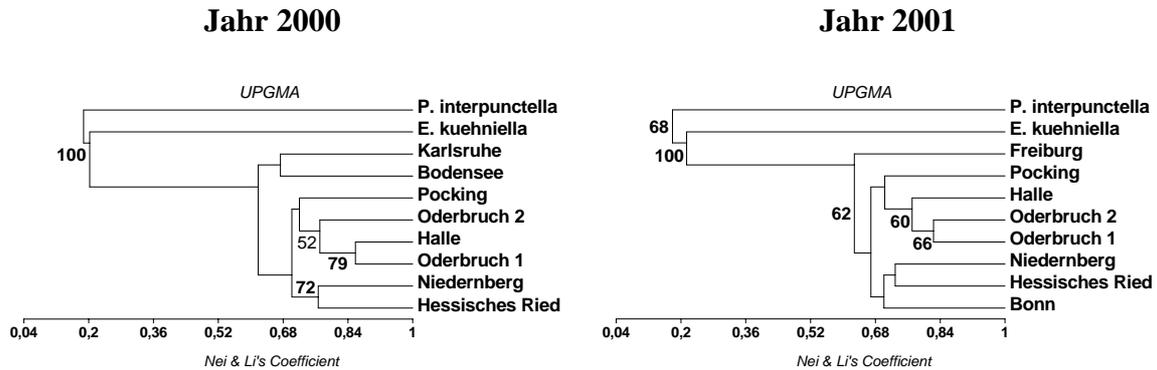


Abb. 37: MVSP-basierte Auswertung der RAPD-Muster (Nei- & Li-Koeffizient) von verschiedenen *O. nubilalis*-Populationen und Populationen der Außengruppen *Plodia interpunctella* und *Ephestia kuehniella* von zwei Jahren unter Angabe der Bootstrapwerte von ≥ 50 (100 Wiederholungen); 0/1-Tab. im Anhang 8g

Die RAPD-Muster der zwei Außengruppen wiesen sowohl 2000 als auch 2001 starke Unterschiede zu den RAPD-Mustern der *O. nubilalis*-Populationen auf (Abb. 37). Diese Abgrenzung wurde mit dem höchsten Bootstrapwert von 100 % bestätigt. Dabei wurde weiterhin deutlich, dass sich die Gattung *Plodia* genetisch stärker von der Gattung *Ostrinia* abhebt, als die Gattung *Ephestia*.

Die in beiden Auswertungen erzielte deutliche Abgrenzung der Lokalpopulation Bonn von allen anderen Lokalpopulationen (Abb. 45) ist dadurch zu erklären, dass sie aus einer mengenmäßig gleichverteilten Mischung von Larven der Z- und E-Rasse besteht. Dieser rassenspezifische Unterschied konnte in Auswertung 1 mit einem Bootstrapwert von 82 % gesichert werden. Die Sonderstellung der Lokalpopulation Bonn zeigte sich auch in der Auswertung 2, die jedoch einen geringeren Bootstrapwert von 56 % aufwies. Die Population Bonn muss daher ebenfalls als Außengruppe betrachtet werden. Dieses Ergebnis führte zu dem Schluss, dass bei der Auswahl von lokalen Populationsproben der Z-Rasse ein möglicher Anteil an E-Rasse auszuschließen ist!

Fazit: Die RAPD-Muster von *O. nubilalis* waren im Vergleich mit zwei anderen Arten aus der Familie der Pyralidae hoch artspezifisch und erfüllten damit eine wichtige Voraussetzung für die Verwendung auf Populationsebene. Bedeutende Anteile von DNA der E-Rasse in einer Mischprobe modifizierten die populationspezifischen RAPD-Muster der Z-Rasse. Um auszuschließen, dass DNA von Larven der E-Rasse die Tiergruppen-

DNA-Extraktion verunreinigen, muss das Probenmaterial im zentralen Bereich eines Maisfeldes gesammelt werden.

3.3.2 Vergleich von mehreren deutschen Lokalpopulationen aus den Jahren 1999, 2000 und 2001 sowie die Validierung von zwei DNA-Proben aus einer Lokalpopulation

Die populationsgenetischen Untersuchungen wurden im wesentlichen mit DNA-Proben von den fünf Hauptstandorten Oderbruch, Halle, Niedernberg, Hessisches Ried und Pocking über die Jahre 1999, 2000 und 2001 durchgeführt. Die jährlichen Wiederholungen waren notwendig, um die zeitliche Stabilität der genetischen Gruppierung der Populationen zu überprüfen. Des Weiteren wurden in den Jahren 2000 und 2001 für den Standort Oderbruch eine zweite lokale Populationsprobe zur Absicherung der Standortcharakteristik herangezogen.

3.2.2.1 Jahr 1999

Im Jahr 1999 standen Larven aus den fünf Hauptstandorten und dem Standort Karlsruhe für die populationsgenetischen Untersuchungen zur Verfügung.

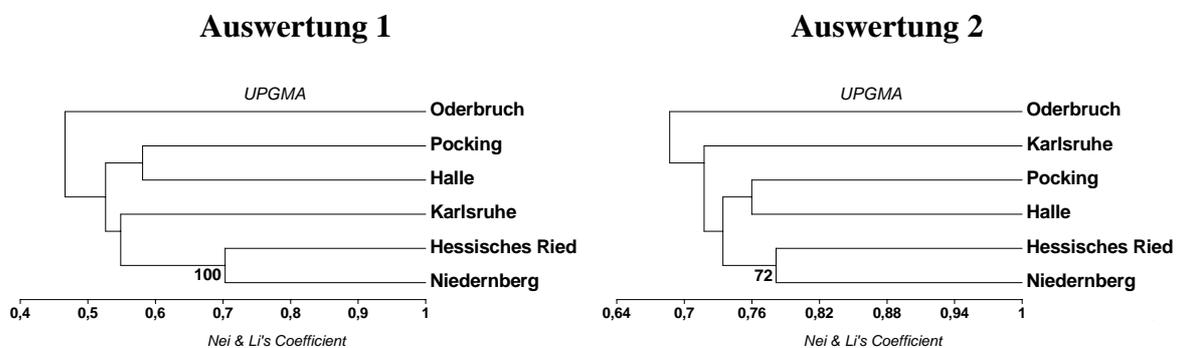


Abb. 38: MVSP-basierte Auswertung der RAPD-Muster (Nei- & Li-Koeffizient) von allen untersuchten *O. nubilalis*-Standorten aus dem Jahr 1999 unter Angabe der Bootstrapwerte von ≥ 50 (100 Wiederholungen) durch zwei Personen (Auswertung 1 & 2); 0/1-Tab. im Anhang 8i

In der Auswertung 1 ergab sich eine enge genetische Ähnlichkeit (Verwandtschaft) zwischen den Standorten Hessisches Ried und Niedernberg, die durch einen Bootstrapwert von 100 % gestützt wurde (Abb. 38). Diese Gruppierung wurde in der Auswertung 2 mit einem ebenfalls hohen Bootstrapwert von 72 % bestätigt (Abb. 38). Alle anderen

Gruppierungen in beiden Auswertungen konnten durch zu geringe Bootstrapwerte nicht abgesichert werden.

Das Dendrogramm der Auswertung 1 (Abb. 38) wurde bei der Bestimmung der Bootstrapwerte in 20 von 100 Fällen erzeugt.

3.3.2.2 Jahr 2000

Im zweiten Jahr wurde zu den sechs Standorten des Vorjahres eine Lokalpopulation vom Bodensee hinzugenommen.

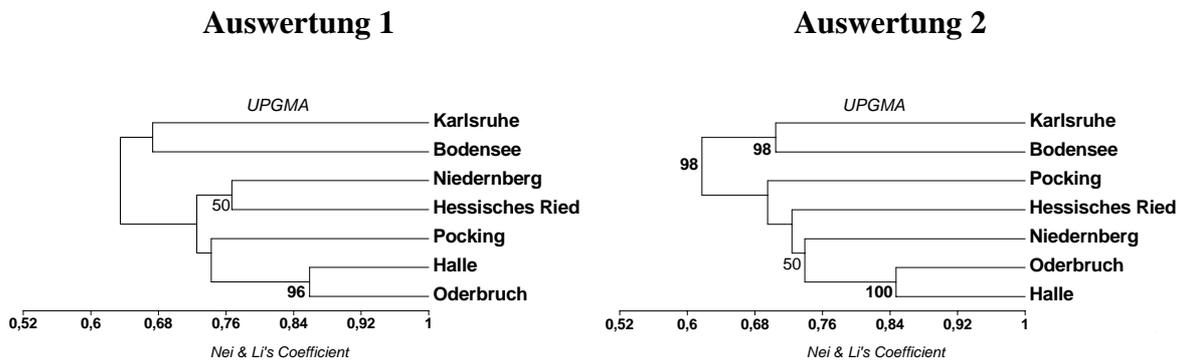


Abb. 39: MVSP-basierte Auswertung der RAPD-Muster (Nei- & Li-Koeffizient) von allen untersuchten *O. nubilalis*-Standorten aus dem Jahr 2000 unter Angabe der Bootstrapwerte von ≥ 50 (100 Wiederholungen) durch zwei Personen (Auswertung 1 & 2); 0/1-Tab. im Anhang 8i

Im Jahr 2000 wurde in beiden Auswertungen eine neue Gruppierung der Standorte Oderbruch und Halle sichtbar. Diese große genetische Ähnlichkeit wurde mit Bootstrapwerten von 96 % in Auswertung 1 und 100 % in der Auswertung 2 abgesichert. (Abb. 39).

Die Gruppierung Hessisches Ried und Niedernberg wurde bei der Auswertung 1 erneut dargestellt, konnte aber durch den niedrigen Bootstrapwert von 50 % nicht abgesichert werden. In der Auswertung 2 wurde diese Gruppierung nicht erzielt. Stattdessen gliederte sich die Lokalpopulation Niedernberg mit einem Bootstrapwert von 50 % zwischen die Gruppe Oderbruch/Halle auf der einen Seite und die Lokalpopulation Hessisches Ried auf der anderen Seite.

Die Lokalpopulationen Karlsruhe und Bodensee hoben sich in beiden Dendrogrammen deutlich von den anderen Lokalpopulationen ab. In der Auswertung 1 konnte nur ein geringer Bootstrapwert ermittelt werden, wohingegen in Auswertung 2 diese Gruppierung

durch den hohen Bootrapwert von 98 % abgesichert wurde. Das Dendrogramm der Auswertung 1 erschien bei der Auswertung der Bootstrapwerte in 9 von 100 Fällen.

Weiterhin wurde mit der RAPD-PCR für den Standort Oderbruch eine Validierung von zwei lokalen Populationsproben vorgenommen. Dabei ergab sich für das Jahr 2000 eine höhere genetische Ähnlichkeit zwischen einer lokalen Oderbruch-Population und der Lokalpopulation Halle mit einem Bootstrapwert von 79 % gegenüber der zweiten lokalen Oderbruch-Population (Abb. 37). Die Lokalpopulation Oderbruch 2 setzte sich mit einem geringen Bootstrapwert von 52 % von der Gruppe Oderbruch/Halle ab. Dennoch blieb die Gruppe Oderbruch/Halle erhalten.

3.3.2.3 Jahr 2001

Im Jahr 2001 wurden die Standorte Karlsruhe und Bodensee wegen fehlendem Probenmaterial durch die Standorte Freiburg und Bonn ausgetauscht.

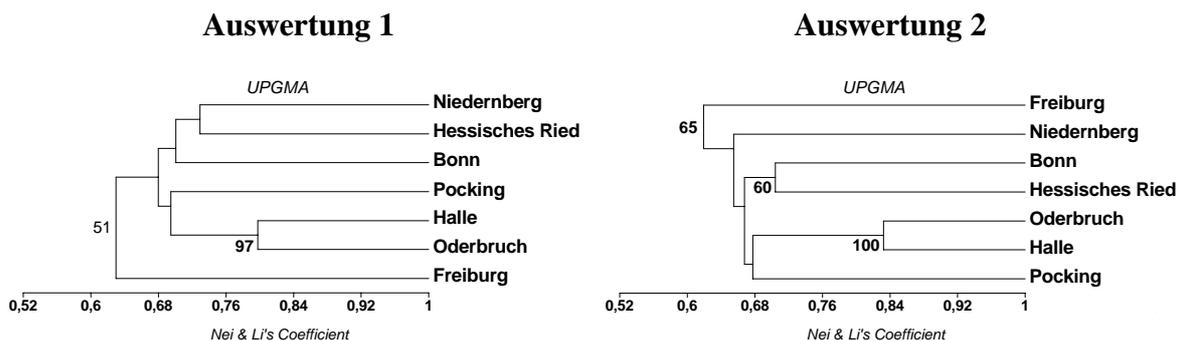


Abb. 40: MVSP-basierte Auswertung der RAPD-Muster (Nei- & Li-Koeffizient) von allen untersuchten *O. nubilalis*- Standorten aus dem Jahre 2001 unter Angabe der Bootstrapwerte von ≥ 50 (100 Wiederholungen) durch zwei Personen (Auswertung 1 & 2); 0/1-Tab. im Anhang 8i

Zwischen den Lokalpopulationen Oderbruch und Halle wurde die höchste genetische Ähnlichkeit erzielt (Abb. 40). Aufgrund der im Vergleich mit dem Vorjahr wiederholt erzielten Gruppierung und der Validierung beider Auswertungen mit Bootstrapwerten von 97 % (Auswertung 1) bzw. 100 % (Auswertung 2), kann diese Gruppe als abgesichert angesehen werden. Da in der Auswertung 2 noch zwei weitere Gruppierungen durch einen hohen Bootstrapwert abgesichert wurden, kann dieses Dendrogramm wahrscheinlich die genetischen Ähnlichkeiten zwischen den Lokalpopulationen besser erfassen als in Auswertung 1. Der zweite relativ hohe Bootstrapwert von 65 % zeigte sich bei der Separierung der Lokalpopulation Freiburg von allen anderen Lokalpopulationen. In der Auswertung 1 konnte durch einen niedrigen Bootstrapwert von 51 % nur eine Tendenz

dieser Abgliederung aufgezeigt werden. Bei dem dritten hohen Bootstrapwert der Auswertung 2 handelte es sich um die Gruppierung Bonn und Hessisches Ried mit einem Wert von 60 %. Im Vergleich dazu gliederte sich in der Auswertung 1 die Lokalpopulation Bonn von der Gruppe Niedernberg/Hessisches Ried mit einem geringen Bootstrapwert von < 50% ab.

Auch in diesem Jahr wurde eine zweite lokale Oderbruch-Population in die Auswertung einbezogen. Mit einem Bootstrapwert von 66 % konnte der Standort Oderbruch diesmal durch die Gruppierung der Lokalpopulationen 1 und 2 abgesichert werden. Von dieser Gruppierung gliederte sich der Standort Halle mit einem Bootstrapwert von 60 % ab.

Fazit: In zwei von drei Untersuchungsjahren konnte eine große genetische Ähnlichkeit zwischen den Lokalpopulationen Oderbruch und Halle über hohe Bootstrapwerte gesichert werden. Die Gruppe Hessisches Ried/Niedernberg wurde im Jahr 1999 in beiden Auswertungen abgesichert, in den anderen Jahren war nur eine Tendenz in der genetischen Ähnlichkeit zwischen diesen beiden westdeutschen Lokalpopulationen erkennbar. Die Abspaltung der südwestdeutschen Lokalpopulationen Karlsruhe, Bodensee und Freiburg sowie der südostdeutschen Lokalpopulation Pocking von den nördlicher gelegenen Lokalpopulationen konnte in der Auswertung 2 mit hohen Bootstrapwerten gesichert werden.

3.3.3 Vergleich von deutschen lokalen *O. nubilalis*-Populationen über einen Zeitraum von zwei und drei Jahren

Da bei den RAPD-Auswertungen aus jeweils einem Jahr aufgrund der geringen Bootstrapwerte wenig gesicherte Ergebnisse gewonnen wurden, war das nächste Ziel, Dendrogramme zu erstellen, welche alle 0/1-Matrixen von zwei und drei Jahren enthalten. Dabei wurden folgende vier Varianten untersucht: a) gemeinsame Verrechnung der 0/1 Matrixen von 20 Primern aus drei Jahren von den fünf deutschen Hauptstandorten (Abschnitt 3.3.3.1); b) als Wiederholung getrennte Verrechnung der 0/1 Matrixen von den drei deutschen Lokalpopulationen Oderbruch, Hessisches Ried und Pocking von drei Jahren mit drei Primern und gleichzeitige Durchführung des Permutationstestes (Abschnitt 3.3.3.2); c) gemeinsame Verrechnung der 0/1 Matrixen aus den Jahren 1999 – 2000 von den fünf deutschen Hauptstandorten und Karlsruhe (Abschnitt 3.3.3.3); d) DNA-Mischungen von 20-Tiergruppen-DNA-Extrakten aus zwei Jahren von jeweils neun deutschen Lokalpopulationen (Abschnitt 3.3.3.4). Die Varianten b) und d) basieren auf

neuen RAPD-Muster-Auswertungen, d. h. es wurde jeweils eine erneute Gelelektrophorese durchgeführt.

3.3.3.1 Clusteranalyse der Lokalpopulationen Oderbruch, Halle, Hessisches Ried, Niedernberg und Pocking über die Jahre 1999, 2000 und 2001

Für die Erstellung des Dendrogramms wurden die 0/1 Matrixen von fünf Lokalpopulationen aus drei Jahren zusammen in einer Excel-Tabelle untereinander angeordnet und unter MVSP verrechnet.

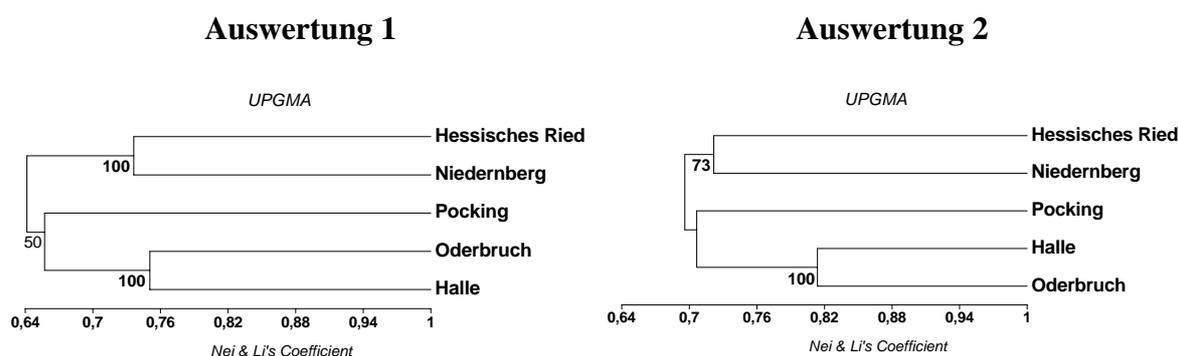


Abb. 41: MVSP-basierte Auswertung der RAPD-Muster (Nei- & Li-Koeffizient) von fünf *O. nubilalis*-Standorten über die Jahre 1999, 2000 und 2001 unter Angabe der Bootstrapwerte ≥ 50 (100 Wiederholungen) durch zwei Personen (Auswertung 1 & 2); 0/1-Tab. im Anhang 8j

In beiden Auswertungen zeigte sich eine hohe genetische Ähnlichkeit zwischen den Standorten Oderbruch und Halle sowie dem Hessischen Ried und Niedernberg (Abb. 41). Die Lokalpopulation Pocking zeigte keine eindeutige Zuordnung zu den anderen beiden Gruppen. Die Ähnlichkeit der Lokalpopulation Pocking zur Gruppe Oderbruch/Halle konnte nicht abgesichert werden. Auffällig war, dass sich die Lokalpopulation Pocking in der Auswertung 1 bei allen 100 Pseudodendrogrammen nie mit einer anderen Lokalpopulation gruppierete. In beiden Auswertungen wurden, außer beim Standort Pocking, hohe Bootstrapwerte erzielt. Die Gruppierung der Lokalpopulationen Oderbruch und Halle erreichten in beiden Auswertungen einen Bootstrapwert von 100 %, trotz der von allen anderen Lokalpopulationen abweichenden Oderbruch-Probe aus dem Jahr 1999. Die Lokalpopulationen Hessisches Ried und Niedernberg zeigten in der Auswertung 1 einen Bootstrapwert von 100 % und in der Auswertung 2 einen von 73 %. Das Dendrogramm der Auswertung 1 wurde bei der Bestimmung der Bootstrapwerte in 48 von 100 Fällen erzeugt.

Für jedes erstellte Dendrogramm der Auswertung 1 wurde eine Häufigkeit der Bandenverteilung graphisch dargestellt (Abb. 42).

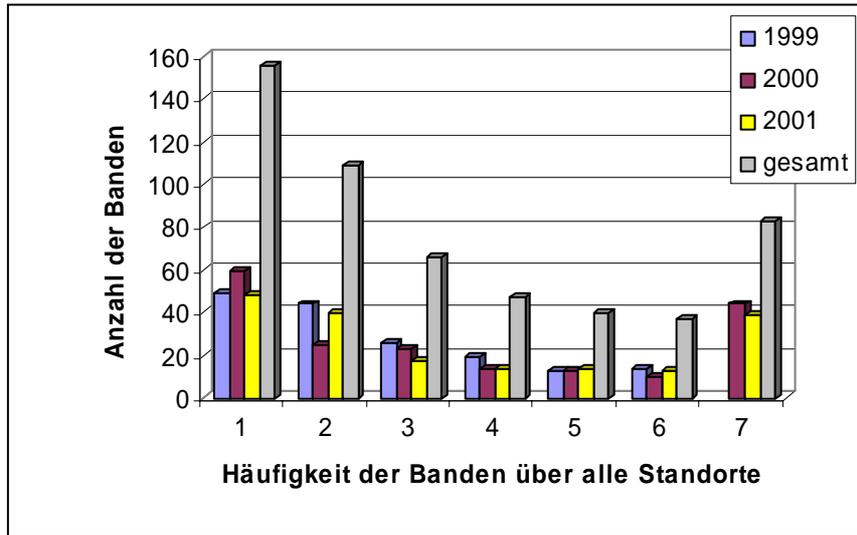


Abb. 42: Häufigkeiten der Bandenverteilung über alle *O. nubilalis*-Standorte aus den Jahren 1999, 2000 und 2001 (1 = polymorph, d. h. insgesamt eine Bande bei allen 7 Standorten; 7 = monomorph, d. h. Bande bei allen Standorten vertreten); Excel-Tab. Anhang 8k

Als „monomorphe Banden“ werden diejenigen Banden eines Primers bezeichnet, die in allen Lokalpopulationen auftreten. Demzufolge sind „polymorphe Banden“ jene Banden, die sich in mindestens einer Lokalpopulation zu den anderen Lokalpopulationen unterscheiden. In den drei Jahren 1999–2001 sind in die populationsgenetischen Auswertungen stets mehr polymorphe (durchschnittlich 147 Banden/Jahr) als monomorphe Banden (durchschnittlich 32 Banden/Jahr) eingegangen. Weiterhin ist eine deutliche Abnahme der Bandenanzahl von den stark polymorphen zu den schwach polymorphen Banden zu erkennen (Abb. 42). Durch die hohe Anzahl an stark polymorphen Banden gegenüber den schwach polymorphen und monomorphen Banden ist ein gewisses Potential für populations- und gruppenspezifische Marker vorhanden. Als gruppenspezifische Marker werden jene Banden bezeichnet, die bei mehreren Lokalpopulationen auftreten und möglicherweise eine Population darstellen. Da sich die monomorphen Banden für die Erstellung der Dendrogramme, basierend auf den Distanzmaßen nach NEI & LI (1979), nur im Ähnlichkeitskoeffizienten ausprägen und keinen Einfluss auf die Struktur des Dendrogramms ausüben, ist ihre Anzahl von geringerer Bedeutung für die populationsgenetische Auswertung als die polymorphen Banden. Die Leistung eines Primers, d. h. die Anzahl auswertbarer Banden, zeigte sich sowohl bei den polymorphen als auch bei den monomorphen Banden.

3.3.3.2 Clusteranalyse der Lokalpopulationen Oderbruch, Hessisches Ried und Pocking jeweils über die Jahre 1999, 2000 und 2001

Neben den jährlichen Auswertungen sollte geprüft werden, ob eine geringe Anzahl an Primern mit hohem Polymorphiegrad ausreichend ist, um die genetische Ähnlichkeit innerhalb einer Lokalpopulation über einen Zeitraum von drei Jahren abzubilden. Beispielhaft wurden die drei Lokalpopulationen Oderbruch, Hessisches Ried und Pocking mit jeweils drei Jahreswiederholungen ausgewählt und mit den polymorphen Primern OPC-15 und OPF-03 sowie dem weniger polymorphen Primer OPB-01 untersucht. Die DNA-Proben wurden in einer gemeinsam angesetzten PCR und der parallelen Auftragung auf ein Agarosegel bearbeitet (Abb. 43).

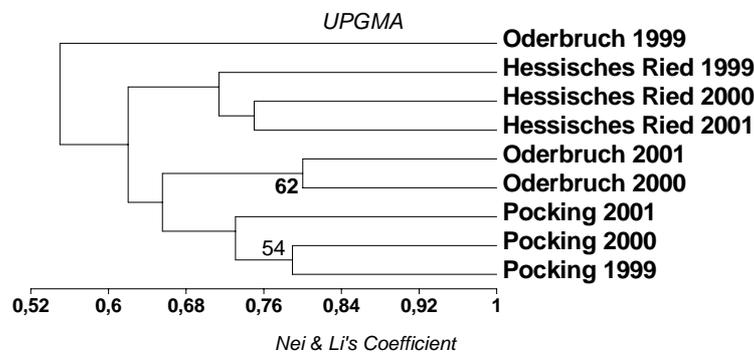


Abb. 43: MVSP-basierte Auswertung der RAPD-Muster (Nei & Li-Koeffizient) von drei *O. nubilalis*-Standorten mit jeweils drei Wiederholungen aus den Jahren 1999, 2000 und 2001 unter Angabe der Bootstrapwerte ≥ 50 (100 Wiederholungen); 0/1-Tab. im Anhang 81

Innerhalb eines Standortes sind zwischen den drei Jahren teilweise erhebliche Unterschiede im RAPD-Muster zu erkennen. Die größten jährlichen Divergenzen sind bei dem Standort Oderbruch sichtbar. Trotz der jährlichen Schwankungen innerhalb eines Standortes gelang eine gemeinsame Gruppierung aller standortspezifischen Lokalpopulationen aus den einzelnen Jahren, ausgenommen die Probe Oderbruch aus dem Jahr 1999. Ein hoher Bootstrapwert mit 62 % wurde jedoch nur bei den Lokalpopulationen Oderbruch 2000 und 2001 erzielt und ein geringer Bootstrapwert von 54 % bei den Lokalpopulationen Pocking 1999 und 2000. Daher kann nur die Tendenz aufgezeigt werden, dass trotz der unterschiedlichen RAPD-Muster in den verschiedenen Jahren die Standortcharakteristik beibehalten wird, aber nicht durch hohe Bootstrapwerte größer als 60 % bei einer Auswahl von drei Primern abgesichert werden kann. Warum sich die Probe Oderbruch 1999 von den anderen lokalen Oderbruch-Populationen und allen weiteren Standorten separierte, kann

nicht erklärt werden. Die Besonderheit dieser Lokalpopulation (Jahr 1999) zeigte sich bereits bei früheren Analysen (Abb. 38).

Das Dendrogramm der Abb. 43 kann weiterhin eine Aussage zur genetischen Ähnlichkeit innerhalb einer Lokalpopulation (intrapopulationsspezifisch) und zwischen den verschiedenen Lokalpopulationen (interpopulationsspezifisch) treffen. Für die intrapopulationsspezifische Auswertung wurde der Anteil gemeinsamer RAPD-Banden, einschließlich monomorpher Banden, innerhalb einer Lokalpopulation mit jährlich einer Wiederholung in einem Zeitraum von drei Jahren ermittelt. Für die interpopulationsspezifische Auswertung wurde der Anteil gemeinsamer RAPD-Banden pro Jahr (1999-2001) bzw. über drei Jahre von den drei Lokalpopulationen berechnet.

Tab. 31: Anteil gemeinsamer RAPD-Banden (F) der Primer OPB-01, OPF-03 und OPC-15 innerhalb und zwischen den 20-Tiergruppen-DNA-Extrakten der Lokalpopulationen Oderbruch, Hessisches Ried und Pocking mit jeweils drei Wiederholungen (1999, 2000, 2001)

F	intrapopulationsspezifisch			interpopulationsspezifisch			
	Oderbruch (1999, 2000, 2001)	Hessisches Ried (1999, 2000, 2001)	Pocking (1999, 2000, 2001)	1999 (O, HR, P)	2000 (O, HR, P)	2001 (O, HR, P)	1999- 2001 (O, HR, P)
MW	0,69	0,71	0,69	0,54	0,66	0,64	0,46
±	±	±	±	±	±	±	±
SD	0,28	0,28	0,32	0,28	0,29	0,28	0,32

MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung; O = Oderbruch; HR = Hessisches Ried; P = Pocking; Berechnung der MW und SD im Anhang 8m

Wie aus Tabelle 31 ersichtlich wird, beträgt die genetische Ähnlichkeit innerhalb einer lokalen *O. nubilalis*-Population ca. 70 % und zwischen den Lokalpopulationen pro Jahr 54 % – 66 %. Die interpopulationsspezifische Ähnlichkeit zwischen den Lokalpopulationen über drei Jahre betrug nur noch 46 %. Der große Unterschied zwischen der intra- und interpopulationsspezifischen Auswertung des Standortes Oderbruch, gegenüber den anderen beiden Standorten, wurde durch die lokale Populationsprobe aus dem Jahre 1999 erhalten.

Neben den F-Werten (Ähnlichkeiten) wurden die Hs-Werte (Heterozygotität) von allen Lokalpopulationen berechnet, bei denen jedoch keine monomorphen Banden berücksichtigt wurden. Aus den Hs- und H_T-Werten ergab sich ein Fixierungsindex F_{ST} von 0,425 (Tab. 32), d. h. dass 43 % genetische Variationen auf die Lokalpopulationen und

57 % auf jährliche Einflüsse zurückgehen. Daraus ergibt sich nach WRIGHT (1978) eine große genetische Differenzierung zwischen den lokalen *O. nubilalis*-Populationen. Die daraus resultierende Migrationsrate (N_m) von 0,338 gibt eine geringe Migration von ca. einem Migranten in jeder 4. Generation an.

Tab. 32: F-Statistik zwischen den Lokalpopulationen Oderbruch, Hessisches Ried und Pocking von *O. nubilalis* anhand von Tiergruppen-DNA-Extrakten über die Jahre 1999, 2000 und 2001 von drei Primern (OPB-01, OPF-03 und OPC-15)

Lokal- populationen	H_S	H_T, F_{ST}, N_m
Oderbruch	0,244	$N = 3$ a 20 Larven $L = 40$ $H_T = 0,348 \pm 0,114$ $F_{ST} = \mathbf{0,425}$ $N_m = \mathbf{0,338}$
HR	0,200	
Pocking	0,156	
MW \pm SD	$0,200 \pm 0,044$	

N = Anzahl der Gruppen; L = (Loci) Anzahl der polymorphen Banden; H_S = Heterozygotität der Lokalpopulation; H_T = Heterozygotität der gesamten Art; F_{ST} = Fixierungsindex; N_m = Migration; Berechnung von MW und SD im Anhang 8n

Die 0/1-Matrixen dieser drei Lokalpopulationen wurden einem Permutationstest unterzogen, der mit Hilfe eines an der Universität Magdeburg entwickelten Programms (pers. Mitt. Dr. KROPF) durchgeführt wurde. Die genetischen Unterschiede zwischen den drei Lokalpopulationen (Oderbruch, Pocking und Hessisches Ried) konnten im Permutationstest mit einem $P = 0,028$ gesichert werden. Somit kann jeder der drei *O. nubilalis*-Standorte als eigenständig betrachtet werden. Eine ähnliche Tendenz zeigte sich auch im Dendrogramm, mit Ausnahme der Oderbruch-Probe 1999. Die Lokalpopulationen Oderbruch und Pocking wiesen gegenüber dem Hessischen Ried eine höhere genetische Ähnlichkeit auf. Ein Permutationstest sollte nur durchgeführt werden, wenn mehrere Jahreswiederholungen von RAPD-Mustern innerhalb eines Standortes auf einem gemeinsamen Agarosegel vorliegen. Da in der vorliegenden Arbeit nur bei fünf Standorten drei Jahreswiederholungen zur Verfügung standen, wurden aus Zeitgründen drei ausgewählte Standorte einer weiteren Untersuchung unterzogen. Auf eine Auswertung der RAPD-Muster über verschiedene Agarosegele wurde verzichtet, weil diese ungenau und damit fehlerhaft sind.

3.3.3.3 Clusteranalyse der Lokalpopulationen Oderbruch, Halle, Hessisches Ried, Niedernberg, Pocking und Karlsruhe über die Jahre 2000 und 2001

Die Erstellung des Dendrogramms erfolgte nach dem gleichen Auswertungsschema von Abschnitt 3.3.3.1, wobei für diese Auswertung die Lokalpopulationen der fünf Hauptstandorte und die Lokalpopulation Karlsruhe von zwei Jahren herangezogen wurden.

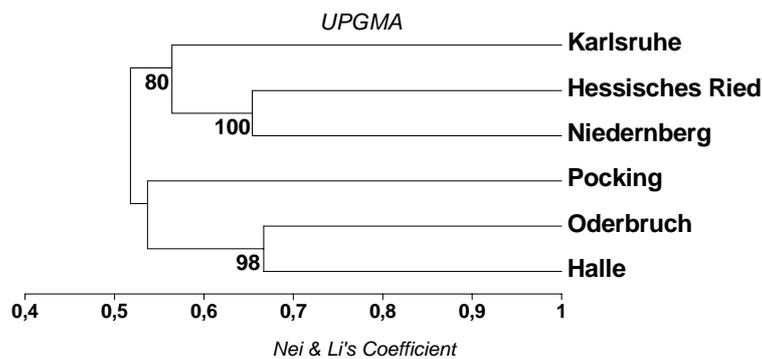


Abb. 44: MVSP-basierte Auswertung der RAPD-Muster (Nei & Li-Koeffizient) von sechs *O. nubilalis*-Standorten aus den Jahren 1999 und 2000 unter Angabe der Bootstrapwerte von ≥ 50 (100 Wiederholungen) durch zwei Personen (Auswertung 1 & 2); 0/1-Tab. im Anhang 8o

In dem Dendrogramm von Abb. 44 wurden hohe Bootstrapwerte von 98 % und 100 % für die Gruppen Oderbruch/Halle bzw. Hessisches Ried/Niedernberg ermittelt. Die Lokalpopulation Pocking konnte erneut aufgrund des geringen Bootstrapwertes < 50 % nicht zur Gruppe Oderbruch/Halle abgesichert werden. Die Lokalpopulation Karlsruhe zeigte zur Gruppe Hessisches Ried/Niedernberg eine hohe genetische Ähnlichkeit mit einem Bootstrapwert von 80 %.

3.3.3.4 Clusteranalyse von neun deutschen Lokalpopulationen mit jeweils einer 40er-Gruppe

Es wurde geprüft, ob die genetischen Beziehungen zwischen den Lokalpopulationen aus jeweils einem Jahr ähnlich denen aus einer Mischung von zwei Jahren sind. Daher wurden für alle neun Standorte, die innerhalb der drei Jahre untersucht wurden, je ein 20er-Tiergruppen-DNA-Extrakt einer Lokalpopulation aus zwei Jahren zu einem 40er-Tiergruppen-DNA-Extrakt gemischt und diese DNA-Mischung mit den ersten zehn Primern aus Tabelle 5 in der RAPD-PCR untersucht. Die Tabelle 33 listet die verschiedenen DNA-Mischungen der 40er-Gruppen auf, die sich aus den jährlich gewonnenen DNA-Extrakten zusammensetzen. Zur Absicherung der Auswertung 1 wurde

die Auswertung der RAPD-Muster durch eine zweite Person wiederholt (Auswertung 2) (Abb. 45).

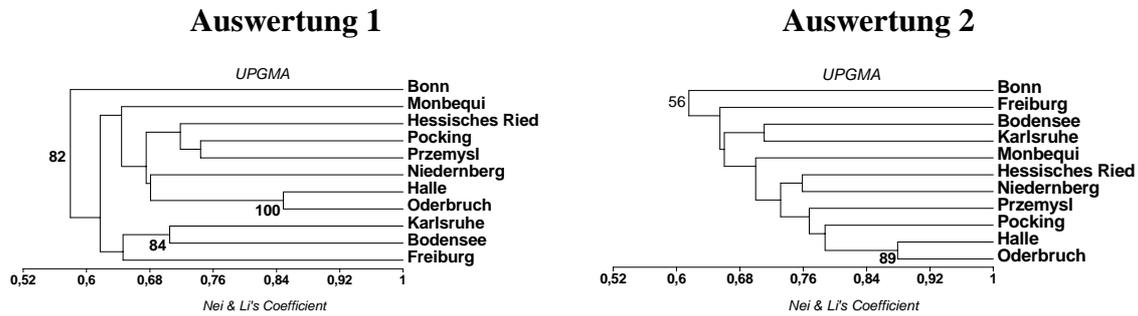


Abb. 45: MVSP-basierte Auswertung der RAPD-Muster (Nei & Li-Koeffizient) von den 40er-Gruppen des Maiszünsler *O. nubilalis* unter Angabe der Bootstrapwerte von ≥ 50 (100 Wiederholungen) durch zwei Personen (Auswertung 1 & 2); Monbequi = Frankreich, Przemysl = Polen, restlichen Standorte – Deutschland; 0/1-Tab. im Anhang 8h

Tab. 33: Zusammensetzung der DNA-Proben zu einem 40er-Tiergruppen-DNA-Extrakt (20 Larven/Jahr)

Standort	Zusammensetzung
Oderbruch	2000 und 2001
Halle	2000 und 2001
Hessisches Ried	2000 und 2001
Niedernberg	2000 und 2001
Pocking	2000 und 2001
Bonn	1999 und 2001
Karlsruhe	1999 und 2000
Freiburg	2001 und 2001
Bodensee	2000 und 2000

Es bestätigte sich erneut eine enge Gruppierung der Standorte Oderbruch und Halle, die die höchsten Bootstrapwerte von 100 % (Auswertung 1) und 89 % (Auswertung 2) erreichten (Abb. 45). Die Gruppierung Hessisches Ried und Niedernberg trat nur in Auswertung 2 auf, jedoch mit einem Bootstrapwert unter 50 %. Die Lokalpopulationen Karlsruhe, Bodensee und Freiburg bildeten im Dendrogramm eine gemeinsame Gruppe, die sich genetisch klar von den anderen deutschen Lokalpopulationen abgrenzte. Einen hohen Bootstrapwert von 84 % erreichte nur die Gruppierung Bodensee und Karlsruhe in Auswertung 1. Diese Gruppierung wurde auch in der Auswertung 2, jedoch mit einem Bootstrapwert < 50 %, bestätigt.

Fazit: Der Vergleich der RAPD-Muster von den einzelnen Jahren und über mehrere Jahre führte zu einer robusten und plausiblen Zuordnung der Lokalpopulationen zu vier Gruppen: norddeutsche Gruppe (Oderbruch, Halle), südostdeutsche Gruppe (Pocking), westdeutsche Gruppe (Hessisches Ried, Niedernberg, Karlsruhe) und südwestdeutsche Gruppe (Karlsruhe, Freiburg, Bodensee).

3.3.4 Vergleich von deutschen Lokalpopulationen mit Lokalpopulationen aus Polen und Frankreich

Um eine Aussage über die genetischen Ähnlichkeiten der einzelnen deutschen lokalen *O. nubilalis*-Populationen zu weiteren europäischen Lokalpopulationen zu treffen, wurden jeweils ein östlich und ein westlich gelegenes Gebiet außerhalb Deutschlands für eine zusätzliche RAPD-PCR gewählt. Bei diesen beiden Standorten handelte es sich jeweils um eine Lokalpopulation aus Polen und aus Frankreich. Dabei wurde untersucht, welches der folgenden Kriterien das RAPD-Muster stärker beeinflusst: Standortbedingungen, geographischer Ursprung oder Migration zwischen den Lokalpopulationen. Eine klare geographische Gliederung der drei Populationspools (Deutschland, Frankreich, Polen) wurde nicht erwartet.

Die beiden zusätzlichen europäischen *O. nubilalis*-Standorte sind als Mischung von zwei 20er-Gruppen zu einer 40er-Gruppe aus dem Jahr 2002 in die Untersuchungen der 40er-Tiergruppen-Extrakte von deutschen lokalen *O. nubilalis*-Populationen eingegangen (Tab. 33).

Aufgrund der geringen Bootstrapwerte $< 50\%$ von Auswertung 1 und 2 in Abb. 45 können die nachfolgenden Aussagen nur eine schwache Tendenz der genetischen Ähnlichkeiten beschreiben. In beiden Dendrogrammen wurde ersichtlich, dass sich die ausländischen Lokalpopulationen in die Populationsbeziehungen der deutschen lokalen *O. nubilalis*-Populationen einordnen (Abb. 45). Die Lokalpopulation Przemysl (Polen) fügte sich am besten in die deutsche Populationsstruktur ein, wohingegen die Lokalpopulation Monbequi (Frankreich) sich zwischen den nordostdeutschen, westdeutschen und südostdeutschen Lokalpopulationen auf der einen Seite und den südwestdeutschen Lokalpopulationen auf der anderen Seite eingliederte. Dabei zeigte sie weiterhin eine geringere genetische Ähnlichkeit zu den südwestdeutschen Lokalpopulationen.

Zwischen den Standorten Pocking und Przemysl wurde in Auswertung 1 eine hohe genetische Ähnlichkeit ersichtlich, die einen Bootstrapwert von 40% erreichte. Zusätzlich

wurden in 28 % der Bootstrapwerte indirekte Gruppierungen sichtbar, d. h. dass die beiden Lokalpopulationen Pocking und Przemysl mit jeweils einer anderen Lokalpopulation eine Gruppe bildeten, von der sich wiederum eine dieser Lokalpopulationen abgliederte. Im Dendrogramm der Auswertung 2 zeigte sich ebenfalls eine hohe genetische Ähnlichkeit zwischen diesen Lokalpopulationen, die jedoch keine gemeinsame Gruppierung ergab.

Von der großen Gruppe Oderbruch, Halle, Hessisches Ried, Niedernberg, Pocking und Przemysl spaltete sich in beiden Auswertungen der Standort Monbequi mit einem geringen Bootstrapwert ab.

Fazit: Die RAPD-Muster der ausländischen Lokalpopulationen gliederten sich aufgrund der ähnlichen genetischen Konstitution in die RAPD-Muster der deutschen Lokalpopulationen ein. Dabei zeigte die ostpolnische Lokalpopulation eine hohe genetische Ähnlichkeit zu der südostdeutschen Lokalpopulation Pocking. Die südfranzösische Lokalpopulation nahm eine Zwischenstellung zwischen den südwestdeutschen Lokalpopulationen und allen anderen nördlicher gelegenen Lokalpopulationen ein. Die hohe Anzahl an Lokalpopulationen (11) in der Cluster-Analyse und die geringe genetische Ähnlichkeit zwischen den Lokalpopulationen führte allerdings zu einer Vielzahl von Bootstrapwerten $< 50\%$.

3.3.5 Auswertung der RAPD-Muster auf populations- und gruppenspezifische DNA-Banden

Die Größe der amplifizierten DNA-Banden aus den Jahren 1999, 2000 und 2001 lag zwischen 200 bp und 2000 bp. Die Primer Roth-A 09, OPC-18, Roth-A 10, OPF-03 und Roth-A 20 deckten besonders deutlich die Unterschiede zwischen den Lokalpopulationen auf. Alle 20 Primer hatten im Durchschnitt über die Jahre 1999 – 2001 80,8 % polymorphe auswertbare Banden amplifiziert. Zur Erklärung der Tabelle 34 werden die beiden Primer Roth-A 18 und Primer Roth-A 20 genauer vorgestellt: Der Primer Roth-A 20 zeigte nur polymorphe Banden mit 100 %, wogegen der Primer Roth-A-18 etwa nur zur Hälfte polymorphe Banden erzeugte. Der Mittelwert charakterisiert den Polymorphiegrad des Primers. Ein stark polymorpher Primer zeichnet sich durch eine hohe Zahl variabler Banden zwischen den Lokalpopulationen aus. Die Standardabweichung (\pm SD) gibt die Varianz der Polymorphiegrade eines Primers über drei Jahre an. Durch die unterschiedlich zusammengesetzten Lokalpopulationen der einzelnen Jahre variierte auch die Anzahl der ausgewerteten Banden pro Primer zwischen den einzelnen Jahren. Weiterhin war der

Primer Roth-A 03 so stark polymorph, dass nur ein Bruchteil seiner Banden ausgewertet werden konnte. Daher bezieht sich der Polymorphiegrad der Tabelle 34 nur auf die ausgewerteten polymorphen Banden und nicht auf die insgesamt amplifizierte Banden. Pro Primer wurden 3 bis 13 Banden ausgewertet (siehe Anhang 6).

Tab. 34: Prozentuale Polymorphiegrade der ausgewählten 20 RAPD-Primer über die Jahre 1999, 2000, 2001

Primer	MW in %	± SD in %	Bandengröße [bp]
Roth-A 18	52,8	41,1	910-1500
Roth-A 12	55,6	9,6	600-1900
Roth-A 02	64,8	30,6	520-1300
Roth-A 11	72,7	32,8	550-1800
OPB-01	73,4	17,3	300-1700
OPA-07	75,0	8,3	200-1700
Roth 180-08	76,3	11,0	400-1900
OPB-08	77,5	12,3	400-2072
OPD-11	79,0	21,4	380-1900
Roth-A 03	79,4	18,0	490-1800
Roth-A 19	82,3	15,7	400-1900
Roth-A 16	84,7	5,4	590-1700
Roth 280-08	85,0	13,2	370-2072
OPC-15	87,7	14,7	300-2072
OPA-05	88,6	11,5	600-1500
Roth-A 09	91,9	7,3	400-1800
OPC-18	94,4	9,6	450-1500
Roth-A 10	96,7	5,8	750-1500
OPF-03	97,6	4,1	300-1600
Roth-A 20	100,0	0,0	750-2072

MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung

Interessant sind die Primer, die PCR-Banden bei nur einer oder zwei Lokalpopulation(en), sogenannte diagnostische Banden (populationsspezifische Markerbanden), amplifiziert haben. Diese diagnostischen Banden können herangezogen werden, um bspw. die weitere Ausbreitung von *O. nubilalis* zu untersuchen. Bei der Bestimmung der

populationsspezifischen Banden wurden jene ausgewählt, die eine hohe Intensität in jedem Jahr aufzeigten. Dabei wurde die Anforderung gestellt, dass diese Markerbande mindestens in zwei von drei untersuchten Jahren eindeutig amplifiziert wurde. Von allen untersuchten Standorten in Deutschland konnten nur die drei Standorte Halle, Karlsruhe und Niedernberg populationsspezifische Banden aufzeigen, die bei allen anderen Standorten nicht vorhanden waren (Tab. 35).

Tab. 35: Charakterisierung von diagnostischen Banden einzelner lokaler *O. nubilalis*-Populationen

Name der Bande	Standort	Bandengröße [bp]	Primer
KB1	Karlsruhe, Bonn	ca. 1800	OPA-05
HRN1	Hessisches Ried, Niedernberg	ca. 2072	OPB-08
N1	Niedernberg	ca. 1990	OPC-15
N2	Niedernberg	ca. 1300	Roth-A 12
N3	Niedernberg	ca. 950 ¹	Roth-A 16
K1	Karlsruhe	ca. 1050	Roth-A 20
H1	Halle	ca. 1000	Roth180-08

¹ – in einer von drei Amplifizierungen ähnlich dem HR

Neben den diagnostischen Banden KB1, N1-N3, K1 und H1 konnten auch zwei gruppenspezifische Markerbanden KB1 und HRN1 identifiziert werden. Die Bande HRN1 bestätigt die Gruppenbildung Hessisches Ried/Niedernberg.

Fazit: Bei fünf von neun Lokalpopulationen konnten auf der Grundlage von sieben RAPD-Primern diagnostische Banden für Lokalpopulationen oder Gruppen von Lokalpopulationen in den RAPD-Mustern identifiziert werden.

3.3.6 Charakterisierung von Lokalpopulationen zu einer Gruppe

Anhand der dreijährigen RAPD-Ergebnisse können die untersuchten deutschen Lokalpopulationen zu vier Gruppen zusammengefasst werden:

1. Nordostdeutschland (Oderbruch, Halle),
2. Südostdeutschland (Pocking),
3. Westdeutschland (Hessisches Ried, Niedernberg, Bonn) und
4. Südwestdeutschland (Karlsruhe, Freiburg, Bodensee).

Da bei allen Gruppen hohe bis mittlere genetische Ähnlichkeiten ermittelt wurden, die

- auf mittleres Niveau des Genflusses durch Migration,
- auf ähnliche natürliche und ackerbauliche (anthropogene) Selektionsbedingungen und/oder
- auf einen gemeinsamen Ursprung

zurückgeführt werden können, sollte geprüft werden, ob diese Gruppen jeweils eine Population darstellen.

Die verschiedenen Gruppen werden in dem folgenden Abschnitt bezüglich dieser drei Punkte wie folgt charakterisiert:

Die **nordostdeutsche Gruppe** mit den Lokalpopulationen Oderbruch und Halle besitzt neben der höchsten genetischen Ähnlichkeit im Vergleich zu den anderen drei Gruppen annähernd gleiche Umweltbedingungen und wird durch keine große Barriere zwischen den beiden Lokalpopulationen topographisch getrennt. Beide Standorte, die sich im Flachland befinden (Tab. 3), zeichnen sich durch die niedrigsten Jahresmitteltemperaturen von ca. 8,5 °C und jährlichen Niederschlagsmengen von ca. 500 mm gegenüber allen anderen Standorten aus (Tab. 3). Allerdings ist durch die große Distanz von 200 km und durch einen geringen bis mittleren Maisanbau zwischen diesen Standorten nur ein geringer Genfluss zu erwarten. Daher müssen die beiden Lokalpopulationen als isolierte Populationen betrachtet werden. Geographisch (> 240 km) wie auch genetisch stehen sie der westdeutschen Gruppe nahe. Topographisch werden sie von der westdeutschen Gruppe durch die Rhön und den Thüringer Wald getrennt.

Die **südostdeutsche Gruppe**, repräsentiert durch den Standort Pocking, stellt ein weiteres Befallsgebiet dar, das sich genetisch auch von allen anderen Standorten abhebt. Hierbei könnte die geographische Distanz von über 300 km sowie geographische Barrieren eine Rolle spielen. Zu der nordostdeutschen Gruppe bildet besonders das Erzgebirge eine starke Barriere. Aufgrund der ähnlich niedrigen Temperaturverhältnisse (Tab. 3) zur norddeutschen Gruppe und den ähnlich hohen Niederschlagswerten zur südwestdeutschen Gruppe nimmt der Standort Pocking klimatisch gesehen eine Zwischenstellung ein. Zur südwestdeutschen Gruppe wirkt das Alpenvorland, besonders die Schwäbische Alb isolierend, die Donauebene hingegen verbindend. Die Fränkische Alb stellt zur westdeutschen Gruppe eine Barriere dar. Die genetische Ähnlichkeit zu den nordost- und westdeutschen Gruppen deutet auf einen gemeinsamen Ursprung hin.

Die **westdeutsche Gruppe** mit den Lokalpopulationen Hessisches Ried und Niedernberg besitzt zur nordostdeutschen Gruppe eine höhere und zur südwestdeutschen Gruppe eine geringere genetische Ähnlichkeit. Die Lokalpopulationen der westdeutschen Gruppe zeichnen sich ebenfalls durch ähnliche klimatische Verhältnisse aus. So haben sie eine Jahresmitteltemperatur von 9 °C – 10 °C, die gegenüber den norddeutschen Standorten um 1 °C - 2 °C höher und gegenüber den südostdeutschen Standorten um ca. 1 °C (ausgenommen Bodensee) niedriger liegt. Auch bei den Niederschlagsmengen mit 600 mm – 700 mm (Tab. 3) nehmen diese Lokalpopulationen eine Zwischenstellung ein. Die Werte sind geringer als bei den süd- und südostdeutschen Standorten, aber höher als bei den norddeutschen Standorten. Innerhalb der Gruppe unterscheiden sich die beiden Lokalpopulationen in der Höhenlage, da das Hessische Ried im Flachland und Niedernberg ca. 170 m NN höher liegt. Bedingt durch diese Höhenlage werden die geringen klimatischen Verhältnisse verursacht. Trotz der geringen Entfernung von 100 km zwischen den Lokalpopulationen ist aufgrund des geringen Maisanbaues zwischen ihnen kein starker Genaustausch möglich. Daher kann auch bei dieser Gruppe von zwei isolierten Populationen ausgegangen werden. Die Gruppe wird zu den südwestdeutschen Standorten einerseits durch den Odenwald getrennt, andererseits steht sie jedoch durch die Rheinebene mit ihnen in Verbindung. Weiterhin besitzt die Lokalpopulation Hessisches Ried eine hohe genetische Ähnlichkeit zum Standort Bonn, die mit den geographischen und klimatischen Verhältnissen (Jahresmitteltemperatur ca. 10 °C) in Einklang steht.

Die **südwestdeutsche Gruppe** mit den Lokalpopulationen Karlsruhe, Freiburg und Bodensee zeichnet sich durch eine mittlere bis große Distanz von 120 km bis 170 km aus. Sie besitzt zu allen anderen Gruppen eine geringe genetische Ähnlichkeit. Innerhalb dieser Gruppe wird deutlich, dass nicht immer ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der genetischen Variabilität und den geographischen, topographischen und klimatischen Verhältnissen besteht. So bildeten die Lokalpopulationen Karlsruhe und Bodensee stets eine gemeinsame Gruppe im Dendrogramm, obwohl sie untereinander eine größere geographische Distanz als zum Standort Freiburg aufweisen (Tab. 36). Weiterhin trennen sie hohe Gebirgskämme des Schwarzwaldes und der Schwäbischen Alb von mindestens 700 m NN. Einerseits bildet die Rheinebene zwischen Karlsruhe und Freiburg eine gute Verbindung zwischen den Lokalpopulationen, andererseits stellt jedoch der schmale Hochrhein zwischen Basel und Bodensee keine gute Kontaktzone zwischen den Maisanbaugebieten dar, weil kein kontinuierlicher Maisanbau stattfindet. Weiterhin werden sie durch grundsätzlich verschiedene klimatische Bedingungen charakterisiert. Der

Standort Bodensee besitzt die niedrigsten Temperaturen (Jahresmitteltemperatur 6,1 °C) und die höchsten Niederschlagsmengen (Jahresmittelniederschlag 1831 mm). Die Standorte Karlsruhe und Freiburg hingegen haben ähnliche Jahresmitteltemperaturen von 10 °C – 11 °C und mittlere Jahresniederschlagsmengen von 770 mm – 950 mm (Tab. 3). Da in Baden-Württemberg neben Bayern der größte Maisanbau zu verzeichnen ist (Tab. 2) und sich viele Maisfelder zwischen den untersuchten Standorten befinden, ist eine starke Migration von *O. nubilalis* möglich. Das intensive Pflügen der Maisfelder, welches kleinere Populationsstärken von *O. nubilalis* zur Folge hat, erlaubt jedoch nur einen geringen Genfluss zwischen den lokalen Populationen. Somit kann die genetische Ähnlichkeit dieser Gruppe stärker auf den gemeinsamen Ursprung zurückgeführt werden. Durch die Separierung der Lokalpopulationen nahmen mit der Zeit die genetischen Unterschiede zwischen ihnen zu. Aufgrund des geringen Genflusses müssen auch diese Lokalpopulationen als drei isolierte Populationen angesehen werden. Die gemeinsamen Merkmale der Gruppe heben sich jedoch deutlich von allen anderen deutschen Populationen ab. Diese Separierung wird einerseits durch die großen genetischen Distanzen (Abb. 45) und geographischen Distanzen von mehr als 200 km und durch deutlich andere klimatische Bedingungen wie höchste Niederschlagsmengen (Tab. 3) gegenüber den anderen Gruppen gestützt.

Neben den geografischen, topografischen und klimatischen Bedingungen spielen auch Unterschiede im **Maisanbau** eine Rolle bei der Charakterisierung der Gruppen. In den süddeutschen Befallsgebieten (Bayern, Baden-Württemberg) ist der größte Körnermaisbau mit 50,1 % von ganz Deutschland zu verzeichnen, und in den südwestdeutschen Befallsgebieten (Baden-Württemberg) besteht auch ein ausgewogenes Verhältnis zwischen Körner- und Silomais. In den anderen Regionen Deutschlands wird hingegen überwiegend Silomais angebaut. Durch den späteren Erntetermin des Körnermais haben Larven von *O. nubilalis* aus südlichen Gebieten Deutschlands eine längere Zeitspanne sich in den unteren Stängelbereich einzubohren, um sich auf die Diapause vorzubereiten. Aufgrund dieser höheren Überlebensraten steigt die genetische Variabilität in diesen Regionen an. Dem gegenüber müssen Larven in Gebieten, in denen hauptsächlich Silomais angebaut wird ein Verhalten entwickeln, das einen schnelleren Entwicklungszyklus fordert. Dies ist notwendig, damit schon frühzeitig Larven in den unteren Teil des Stängels abwandern und damit eine ausreichende Anzahl an Individuen die Maisernte überlebt. Die starke genetische Abgrenzung der südwestdeutschen Standorte

zu allen anderen deutschen Standorten kann auch durch diesen regional verschiedenen Maisanbau verstärkt worden sein.

Da die Lokalpopulationen Oderbruch und Halle die geringsten genetischen Ähnlichkeiten, aber die höchsten geographischen Distanzen aufweisen, kann daraus nur gefolgert werden, dass alle Lokalpopulationen isolierte Populationen mit einem geringen Genfluss darstellen. Die vier Gruppen von Lokalpopulationen sind daher eher auf einen gemeinsamen Ursprung und ähnliche klimatische, geographische, topographische und ackerbauliche Maßnahmen als auf Migration zurückzuführen. Diese Theorie wird weiterhin durch den Permutationstest und den F_{ST} -Werten gestützt, die eine gute Isolierung der Lokalpopulationen aufzeigten.

Bei der Untersuchung der beiden Lokalpopulationen aus **Polen und Frankreich** zeigten diese eine hohe genetische Ähnlichkeit zu allen deutschen Population mit Ausnahme der südwestdeutschen Populationen. So wies die Lokalpopulation aus Südpolen eine hohe genetische Ähnlichkeit mit 76 % zu der Lokalpopulation Pocking auf. Klimatisch betrachtet besitzt sie eine ähnlich niedrige Jahresmitteltemperatur wie die nordostdeutschen Populationen und die Lokalpopulation Pocking, aber Niederschlagswerte, die eher vergleichbar sind mit den westdeutschen Populationen. Die Lokalpopulation aus Frankreich gliederte sich zwischen den südwestdeutschen Populationen und allen anderen deutschen Lokalpopulationen einschließlich der polnischen Lokalpopulation ein. Von den klimatischen Bedingungen ist nur der langjährige mittlere Niederschlagswert mit den westdeutschen Populationen vergleichbar. Die Jahresmitteltemperatur ist hingegen mit ca. 13 °C bedeutend höher als bei allen deutschen Standorten. Aufgrund der großen geographischen Distanzen dieser Standorte zu den deutschen Standorten ist ein Genfluss auszuschließen. Daher sind die genetischen Ähnlichkeiten ebenfalls auf einen gemeinsamen Ursprung zurückzuführen.

Um die Beziehungen von allen deutschen Populationen untereinander zu ermitteln, wurde mit Hilfe des **Manteltestes** (MANTEL, 1967) eine Korrelation zwischen der genetischen Ähnlichkeit und der geographischen Distanz dieser Lokalpopulationen geprüft (Tab. 37). Die genetischen Ähnlichkeitswerte wurden bei den 40er-Gruppen durch eine Mittelung der Werte von Auswertung 1 und 2 erhalten. Die Ergebnisse zeigten, dass keine Korrelation zwischen der genetischen Ähnlichkeit und der geographischen Distanz besteht (Tab. 37). Des Weiteren wurde ein Zusammenhang zwischen der genetischen Ähnlichkeit und den topographischen und klimatischen Verhältnisse (nach dem gleichen Schema wie in Tab. 36

dargestellt) untersucht. Dabei konnte keine Korrelation zwischen der genetischen Ähnlichkeit und den Höhenunterschieden- sowie Temperaturdifferenzen vom Sommer, Winter und über das ganze Jahr ermittelt werden. Zwischen den Niederschlagsdifferenzen und den genetischen Ähnlichkeiten wurde jedoch eine negative Korrelation ermittelt, die sowohl im Sommer und Winter als auch über das ganze Jahr erreicht wurde (Absicherung mit $P = 0,029 - 0,049$). Das bedeutet, dass die genetische Ähnlichkeit zwischen allen Lokalpopulationen zunimmt, wenn die Niederschlagsdifferenz zwischen ihnen abnimmt. Diese Beziehung ist allerdings nicht robust, da mit den fünf Lokalpopulationen Oderbruch, Halle, Hessisches Ried, Niedernberg und Pocking, keine Korrelation erstellt werden konnte (Tab. 37b). Dies lag an der geringen Variation bei den Niederschlagsmengen zwischen den Standorten. Erst bei acht Lokalpopulationen mit entsprechender Variationsbreite konnte bei drei Parametern (Niederschlagsdifferenz von Sommer, Winter und Jahr) eine Korrelation hergestellt werden. Somit konnte eine negative Korrelation zwischen der genetischen Ähnlichkeit und dem klimatischen Merkmal Niederschlag nur mit einer ausreichenden Anzahl an Lokalpopulationen festgestellt werden.

Tab. 36: Berechnung der Korrelation mittels Manteltest zwischen den Nei- und Li-Koeffizienten (Mittelwert der Auswertung 1 und 2) von der 40er-Gruppe der *O. nubilalis*-Standorte und ihre jeweiligen geographischen Distanzen in km (fett dargestellt)

	Oderbruch	Halle	Niedernberg	Hessisches Ried	Karlsruhe	Pocking	Bodensee	Freiburg
Oderbruch		0,864	0,696	0,705	0,676	0,749	0,596	0,602
Halle	200		0,709	0,712	0,636	0,719	0,590	0,622
Niedernberg	440	240		0,718	0,646	0,711	0,607	0,647
Hessisches Ried	540	310	100		0,655	0,720	0,644	0,663
Karlsruhe	590	390	140	400		0,673	0,708	0,650
Pocking	470	350	300	400	380		0,627	0,647
Bodensee	660	480	240	260	170	330		0,657
Freiburg	690	500	260	210	120	430	120	

Tab. 37: Manteltest mit acht und fünf Standorten mit jeweils acht verschiedenen Parametern bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$

a) acht Standorte mit jeweils einer 40er-Gruppe von einem Jahr bzw. zwei Jahren			b) fünf Standorte mit jeweils einer 20er-Gruppe über drei Jahre		
Merkmale	r	P	Merkmale	r	P
Distanz	-0,191	0,253	Distanz	-0,314	0,219
Höhe	-0,270	0,206	Höhe	0,003	0,497
Temp So	-0,389	0,095	Temp So	0,295	0,211
Temp Wi	0,244	0,181	Temp Wi	0,285	0,346
Temp Jahr	-0,336	0,118	Temp Jahr	0,193	0,384
Nied So	-0,465	0,037	Nied So	0,328	0,251
Nied Wi	-0,425	0,049	Nied Wi	0,432	0,199
Nied Jahr	-0,461	0,029	Nied Jahr	0,432	0,165

So = Sommer, Wi = Winter, r = Korrelationskoeffizient, P = Signifikanzwert; Manteltest im Anhang 8p

Fazit: Die genetische Ähnlichkeit der Populationen innerhalb jeder der vier Gruppen ist auf einen gemeinsamen Ursprung und geographische, topographische, klimatische und ackerbauliche Verhältnisse zurückzuführen.

Da keine robuste Korrelation zwischen den klimatischen (Temperatur, Niederschlag), topographischen (Höhe) und geografischen (Distanz) Bedingungen in Verbindung mit den genetischen Ähnlichkeiten gefunden wurde, müssen alle Lokalpopulationen als eigenständige Populationen definiert werden, die eher auf einen gemeinsamen Ursprung als auf einen hohen Genfluss und/oder klimatische Verhältnisse zurückzuführen sind.

3.4 Analyse von ITS-1-Fragmenten der rDNA

3.4.1 Amplifikation von ITS-1-Fragmenten

Die rDNA enthält die Gene, die für ribosomale RNA kodieren und damit für die Bildung der Ribosomen im Cytoplasma verantwortlich sind. Die drei konservierten rDNA-Abschnitte 18S, 5,8S und 28S hat man sich zunutze gemacht, um spezifische Primer zu entwickeln, die in diesen Regionen binden und die „Internal Transcribed Spacer (ITS)“-Bereiche amplifizieren. Die beiden ITS Bereiche (ITS-1 und -2) sind nicht konserviert und können damit einen hohen Grad an Polymorphismus besitzen, der sich durch die

unterschiedliche Basenabfolge der Sequenzen auch in der Länge ausprägen kann. Beide ITS-Bereiche sind häufig verwendete DNA-Segmente bei Populationsstudien und phylogenetischen Gruppierungen nahe verwandter Arten (SCHLÖTTERER, 1998). Basierend auf der Arbeit von MARCON et al. (1999) wurden die Primer ITS-f und ITS-r verwendet, die bei *O. nubilalis* ein ca. 505 bp großes Fragment erzeugten.

Die Primer binden auf einem Teil der konservierten ribosomalen 18S und 5,8S-rDNA, der somit im Amplifikationsprodukt enthalten ist (Abb. 11). Folgende Varianten wurden für die Untersuchung des ITS-1-Fragmentes geprüft:

- zwei Außengruppen *Ephestia kuehniella* und *Plodia interpunctella*;
- von der Z-Rasse die Lokalpopulationen Oderbruch, Halle, Niedernberg, Hessisches Ried, Pocking, Freiburg, Bonn, Karlsruhe, Bodensee, Przemysl (Polen) und Toulouse (Frankreich);
- von der E-Rasse die Lokalpopulationen Halle, Hessisches Ried, Göttingen und Bonn;
- zwei Einzeltiere der Lokalpopulation Oderbruch.

Das ITS-1-Fragment wies deutliche Unterschiede zwischen den drei Arten innerhalb der Familie Pyralidae auf. So sind bei *Plodia interpunctella* neben dem starken 505 bp-Fragment drei weitere schwache Fragmente mit einer Größe von ca. 430, 570 und 1290 bp erzeugt worden und bei *Ephestia kuehniella* nur ist ein kleineres Fragment mit ca. 350 bp. (Abb. 46).

Bei allen Lokalpopulationen der Z- und E-Rasse sowie bei den zwei Einzeltieren von *O. nubilalis* wurde ein einheitlich großes Fragment mit einer Größe von 505 bp amplifiziert (Abb. 46 zeigt nur die Z-Rasse). Aufgrund der einheitlichen Größe des ITS-1-Fragments bei allen *O. nubilalis*-Varianten (Lokalpopulationen und Rassen), konnte auf der Basis der Fragmentgröße keine Differenzierung vorgenommen werden. Daher war es das nächste Ziel, mögliche Unterschiede in der Sequenz mit Hilfe von Restriktionsenzymen zu detektieren.

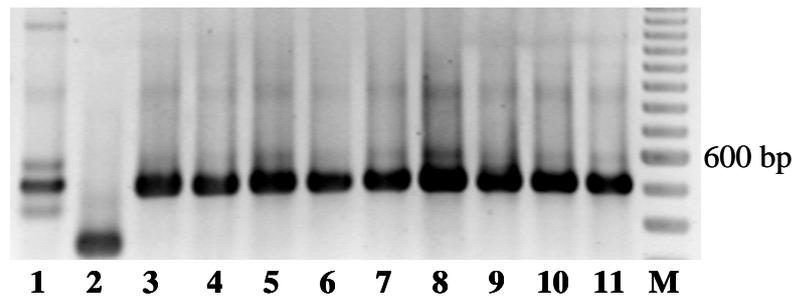


Abb. 46: Amplifizierung der ITS-1-Fragmente von *O. nubilalis*, *Plodia interpunctella* und *Ephestia kuehniella* (**1** = *Plodia interpunctella*, **2** = *Ephestia kuehniella*; *Ostrinia nubilalis*: **3** = Bodensee, **4** = Karlsruhe, **5** = Bonn, **6** = Pocking, **7** = Freiburg, **8** = Hessisches Ried, **9** = Niedernberg, **10** = Halle, **11** = Oderbruch; **M** = 100bp-Marker)

Fazit: Innerhalb der rDNA konnte ein für *O. nubilalis* spezifisches PCR-Produkt von ca. 505 bp amplifiziert werden. Aufgrund der einheitlichen Größe dieses ITS-1-Fragments bei allen Lokalpopulationen und Rassen, konnte jedoch auf der Basis der Fragmentgröße keine Differenzierung vorgenommen werden.

3.4.2 Differenzierung von ITS-1-Fragmenten mittels RFLP

Für die Restriktionsspaltungen wurden, in Anlehnung an die Untersuchungen über *O. nubilalis* von MARCON et al. (1999) bzw. über Wurzelgallennematoden von SCHMITZ et al. (1998), fünf Restriktionsenzyme ausgewählt. Die nach der ITS-RFLP erhaltenen Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt und ihre Größe mit Hilfe des Programms Scan Pack 3.0 abgeschätzt. Von den fünf eingesetzten Restriktionsenzymen schnitten nur die beiden Enzyme HaeIII und RsaI das 505 bp-Fragment (Abb. 47). Mit dem Enzym HaeIII wurden zwei Fragmente mit einer Größe von ca. 420 bp und 90 bp ermittelt. Das Enzym RsaI erzeugte Fragmente zwischen 100 bp und 200 bp. Daher wurden nur mit diesen beiden Enzymen jeweils fünf Lokalpopulationen von der Z- und E-Rasse getestet (Abb. 48).

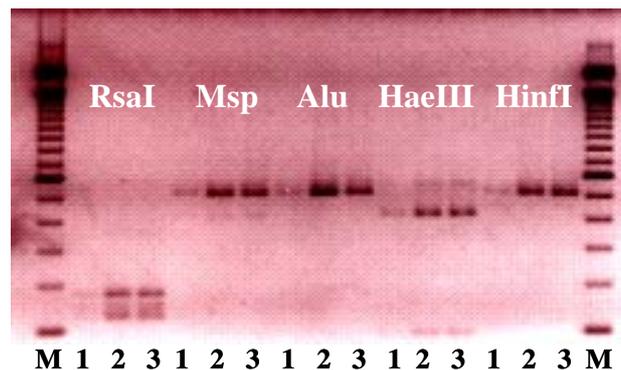


Abb. 47: RFLP von den ITS-1-Fragmenten der E- und Z-Rasse von *O. nubilalis* mit fünf Restriktionsenzymen (1 = E-Rasse, 2, 3 = Z-Rasse; M = Marker; Enzyme: RsaI, Msp, Alu, HaeIII, HinfI)

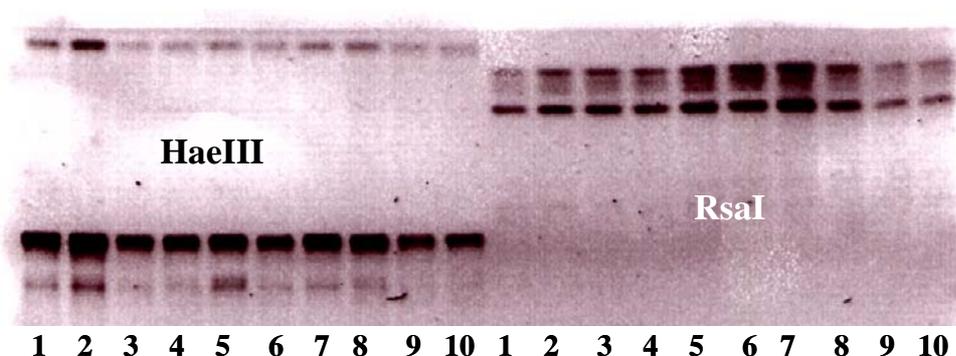


Abb. 48: Spaltprodukte der ITS-1-Fragmente durch die Enzyme HaeIII und RsaI zwischen den Rassen Z und E und innerhalb einer Rasse zwischen verschiedenen Standorten von *O. nubilalis* (1, 6 = Halle, 2, 7 = Hessisches Ried, 3 = Karlsruhe, 4 = Freiburg, 5 = Pocking, 8 = Bonn, 9 = Göttingen, 10 = Reglingenhausen; 1 – 6 = Z-Rasse, 7 – 10 = E-Rasse; Enzyme: HaeIII, RsaI)

Da mit diesen beiden Enzymen zwischen allen getesteten Lokalpopulationen und Rassen von *O. nubilalis* keine Unterschiede festgestellt wurden, war das nächste Ziel eine TGGE durchzuführen, die Punktmutationen außerhalb dieser Restriktionsstellen detektieren kann.

Fazit: Für das 505 bp große ITS-1-Fragment zeigte die RFLP mit fünf Restriktionsenzymen keine Unterschiede zwischen Lokalpopulationen und Rassen von *O. nubilalis*.

3.4.3 Differenzierung von ITS-1-Fragmenten durch die TGGE

Mit Hilfe der TGGE können aufgrund des unterschiedlichen elektrophoretischen Laufverhaltens verschiedener Sequenzen Punktmutationen im 505 bp-Fragment zwischen

Lokalpopulationen und Rassen aufgezeigt werden. Bei der Durchführung der perpendicularen TGGE (Abb. 49A) ist ein optimaler Temperaturbereich für die Denaturierung von Doppelsträngen bei ca. 40 °C ermittelt worden. Für die daraus resultierende parallele TGGE ist ein Temperaturgradient von 37 °C – 42 °C eingestellt worden (Abb. 49B). Alle parallelen TGGE-Gele wurden mit neun Lokalpopulationen der Z- und sechs Lokalpopulationen der E-Rasse durchgeführt (siehe Abschnitt 2.4.5).

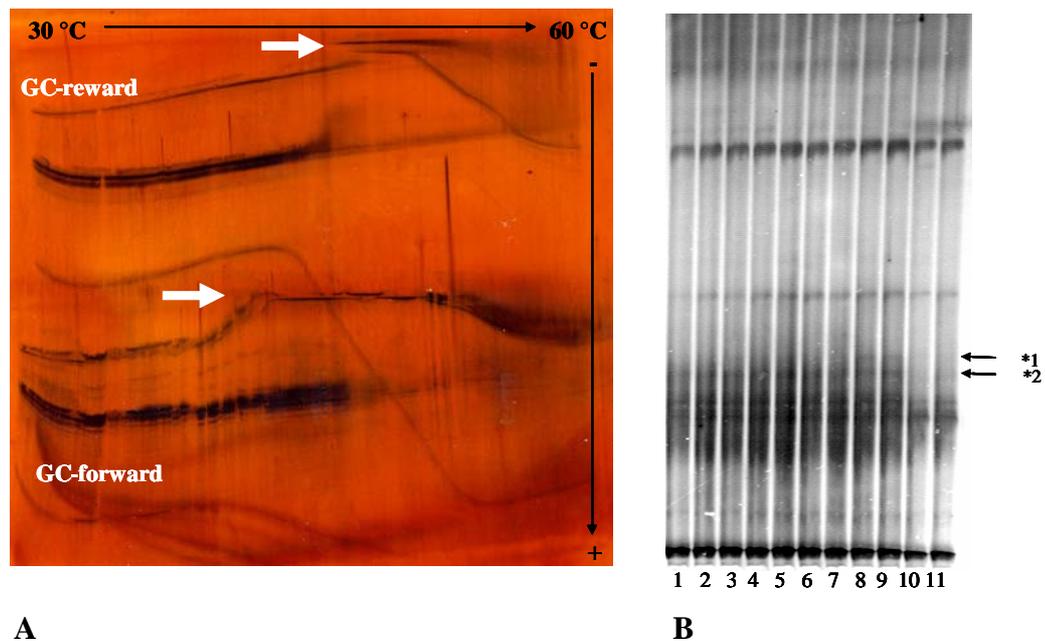


Abb. 49: Konformation der DNA Doppelhelix (A) und TGGE-Gel von den ITS-1-Fragmenten von *O. nubilalis* mit f-GC-Primer (B) (1 = Oderbruch, 2, 9 = Halle, 3 = Niedernberg, 4, 10 = Hessisches Ried, 4 = Freiburg, 5 = Pocking, 6 = Bonn, 7 = Karlsruhe, 8 = Bodensee; 1 – 9 = Z-Rasse, 10 – 11 = E-Rasse; *1 = zusätzlicher ITS-1-Typ für die südwestdeutsche Gruppe, *2 = fehlender ITS-1-Typ bei E-Rasse; Pfeile kennzeichnen das Abknicken der Hauptbanden)

Die verschiedenen linearen TGGE-Analysen (Primer ohne bzw. mit GC-Klammer) ergaben eine unterschiedliche Anzahl an auftrennbaren Banden. Bei der Verwendung von Primern ohne GC-Klammer sind weniger Fragmente (mind. ca. 5) als mit GC-Klammer (mind. ca. 8) aufgetrennt worden. Weiterhin bestanden bei der Amplifizierung zwischen forward und reverse Primer mit GC-Klammer quantitative Unterschiede. Mit dem forward-GC-Primer wurden mehr Banden als beim reverse-GC-Primer aufgetrennt. Bei der linearen TGGE des 505 bp-Fragments ohne GC-Primer und beim Einsatz des reverse-GC-Primers wurden keine Sequenzheterogenitäten zwischen den Lokalpopulationen und Rassen festgestellt. Bei der Amplifikation des 505 bp-Fragments mit einer GC-Klammer am forward-Primer sind unterschiedliche Sequenzheterogenitäten zwischen den Lokalpopulationen und Rassen sichtbar geworden (Abb. 49B). Dabei ist eine zusätzliche Variante des ITS-1-Typs bei den Lokalpopulationen Karlsruhe und Bodensee innerhalb der

Z-Rasse (Abb. 49*1) sowie eine fehlende Variante des ITS-1-Typs bei der E-Rasse (Abb. 49*2) gegenüber allen Lokalpopulationen der Z-Rasse sichtbar geworden.

Da teilweise eine starke, undeutliche Hintergrundfärbung im PAA-Gel bestand und unterschiedliche Einflussfaktoren die Mobilität der Schmelzdomänen in der Weise beeinflussen können, dass Sequenzunterschiede nicht erfasst werden, wurde eine Sequenzierung angestrebt. Des Weiteren kann in großen Molekülen die Ausdehnung und Lage von Schmelzdomänen das Erfassen von Sequenzunterschieden stark beeinflussen, so dass nur ein Teil von ihnen erfasst werden kann.

Fazit: Die Lokalpopulationen Karlsruhe und Bodensee (Z-Rasse von *O. nubilalis*) zeigten durch eine zusätzliche Variante des ITS-1-Typs gegenüber den restlichen Lokalpopulationen Sequenzheterogenitäten im ITS-1-Fragment, die möglicherweise auch durch einzelne Individuen hervorgerufen wurden. Die Rassen unterschieden sich im ITS-1-Fragment durch das Auftreten einer neuen (Z-Rasse) oder durch den Fortfall (E-Rasse) einer Variante.

3.4.4 Differenzierung von ITS-1-Fragmenten durch Sequenzierung

Alle 505 bp großen ITS-1-Fragmente der Tiergruppen-DNA-Extrakte, die jedoch eine unterschiedliche Genomherkunft besitzen können, gingen nach der Kettenabbruch-Methode von SANGER et al. (1977) in die Bestimmung der Nukleotidabfolge ein. Bei der von einer Amplifizierung ausgehenden Sequenzierung werden nur die Fragmente analysiert, die am häufigsten vorhanden sind und damit die gesamte Lokalpopulation charakterisieren. Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass noch weitere Unterschiede zwischen den Lokalpopulationen bestehen, wie aus den TGGE-Ergebnissen deutlich wurde. Insgesamt wurden zehn lokale *O. nubilalis*-Populationen aus Deutschland und je eine Lokalpopulation aus Polen und Frankreich in die Sequenzierung einbezogen. Von den zehn deutschen *O. nubilalis*-Populationen sind drei der E-Rasse zuzuordnen. Außerdem wurde DNA aus zwei Einzeltieren der deutschen lokalen Z-Population Oderbruch sequenziert, um stichprobenhaft die Möglichkeit individuelle Unterschiede innerhalb einer Lokalpopulation abzuschätzen.

Die Sequenzierung konnte keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Lokalpopulationen der Z-Rassen aus Deutschland, Frankreich und Polen aufzeigen (Abb. 50).

Zwischen den Lokalpopulationen und den Einzeltieren der Lokalpopulation Oderbruch zeigte sich in Position 296 eine Abweichung. Die beiden Einzeltiere hatten an dieser Stelle ein A-(Adenin) Nukleotid, bei den Lokalpopulationen hingegen konnte keine Unterscheidung zwischen einem A- oder C-(Cytosin) Nukleotid getroffen werden, daher die Bezeichnung „M“ (Anhang 4).

Zwischen den beiden Rassen Z und E konnten zwei Sequenzunterschiede im ITS-1-Fragment ermittelt werden (Abb. 50). Diese Nukleotidunterschiede bestehen an Position 233 und 242. Bei der ersten Position handelte es sich bei der E-Rasse um eine Deletion des A-Nukleotids, an der zweiten Position um eine Substitution des Nukleotids T- bzw. K=(G/T) bei der E-Rasse durch ein C-Nukleotid bei der Z-Rasse. Das Alignment aller Lokalpopulationen ist im Anhang 4 ersichtlich.

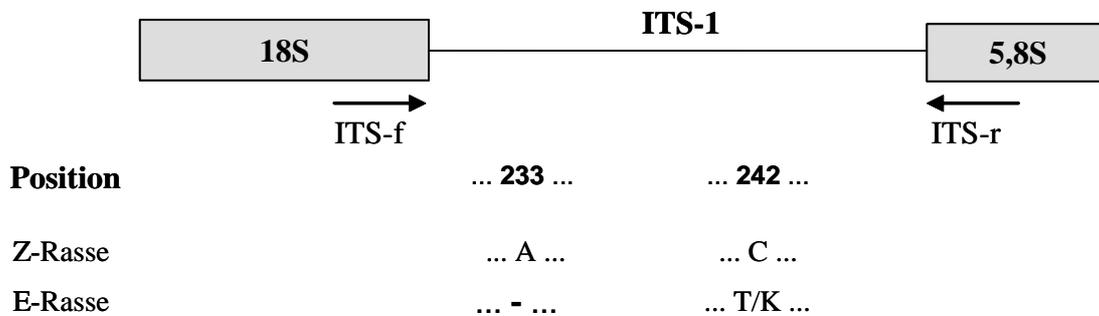


Abb. 50: Schematische Darstellung der Sequenzunterschiede im ITS-1-Bereich zwischen E- und Z-Rasse von *O. nubilalis*

Die mit den Restriktionsenzymen RsaI und HaeIII erhaltenen Fragmente (Abschnitt 3.4.2) konnten nach der Sequenzierung genau ermittelt werden. Das Enzym RsaI hat auf dem 505 bp-Fragment vier Restriktionsstellen (Position 171 bp, 295 bp, 311 bp, 346 bp) und erzeugt daher fünf Fragmente mit den Größen 198 bp, 131 bp, 124 bp, 35 bp und 16 bp. HaeIII hat auf der sequenzierten rDNA nur eine Restriktionsstelle (Position 68 bp) und erzeugt Fragmente von 95 bp und 409 bp (Vergleiche zu Punkt 3.4.2).

Fazit: Die ITS-1-Fragmente der neun lokalen *O. nubilalis*-Populationen der Z-Rasse aus Deutschland, Frankreich und Polen zeigten eine übereinstimmende Sequenz. Zwischen den Lokalpopulationen der E-Rasse und den Lokalpopulationen der Z-Rasse wurden jedoch zwei Sequenzunterschiede festgestellt.

3.4.5 Versuche zur Differenzierung von Z- und E-Rasse mit ITS-1-spezifischen Primern

Aufgrund der Sequenzunterscheide zwischen der E- und Z-Rasse an den Positionen 233 bp und 242 bp wurde das Primerset ecb.ez.2f/2r in Zusammenarbeit mit der Firma CONGEN entwickelt, das eine rassenspezifische Unterscheidung ermöglichen sollte (Tab. 38). Dieses Primerset könnte dazu dienen, Tiergruppen-DNA-Extrakte der Z-Rasse auf Verunreinigung durch die E-Rasse zu untersuchen. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist in der Rassenbestimmung an zukünftig geschädigten Kulturpflanzen zu sehen. Die zwei rassenspezifischen Nukleotidunterschiede werden von dem reversen Primer erfasst. Die Primer wurden so entwickelt, dass ein 144 bp großes Fragment nur bei der E-Rasse amplifiziert wird. Dieses Primerset wurde unter den gleichen PCR- und Thermocycler-Bedingungen wie bei der ITS-1-Amplifizierung getestet.

Bei der Optimierung der Annealingtemperatur wurde ein hoher Temperaturgradient von 60,2 °C – 68,0 °C eingestellt. Die erhöhte Annealingtemperatur sollte eine Primerbindung nur noch bei hoher Sequenzübereinstimmung erlauben. Dabei zeigte sich, dass bei einer Temperatur von 66,0 °C ein quantitativ geringes Amplifikationsprodukt bei der Z-Rasse entstand (Abb. 51). Bei steigender Temperatur variierte jedoch die Menge der Amplifikationsprodukte unabhängig von der Rasse.

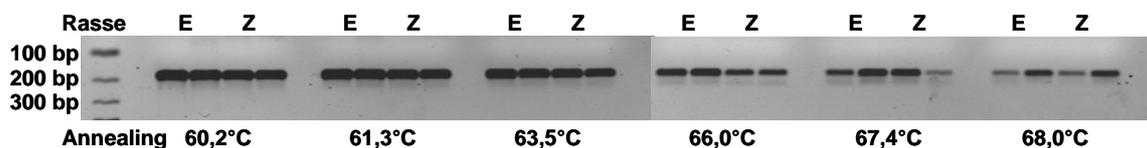


Abb. 51: Optimierung der Annealing-Temperatur von 60 °C – 68 °C für die Primer ecb.ez2f/r zur Unterscheidung der Z- und E-Rasse von *O. nubilalis*

Zur spezifischen Unterscheidung von *O. nubilalis* von anderen Arten oder Gattungen wurde zusätzlich noch ein *O. nubilalis*-spezifisches Primerset ecb.ez.3f/3r entwickelt (Tab. 38). Dieses Primerset amplifiziert eine Bande von 166 bp bei der Z-Rasse und 165 bp bei der E-Rasse bei einer Annealingtemperatur von 60 °C. Es kann zum Nachweis der Art *Ostrinia nubilalis* im Darmtrakt von Prädatoren dienen, da mit Hilfe des Suchalgorithmus von ALTSCHUL et al. (1997) für die Sequenzdatenbank BLAST keine Sequenzübereinstimmung mit anderen Arten ermittelt wurde und der forward-Primer nur bei *O. nubilalis* binden kann.

Tab. 38: Sequenz, G/C-Gehalt und Schmelztemperatur der ITS-1-spezifischen Primer

Primer	Sequenz (5' - 3')	G/C-Gehalt	Tm [°C]
ecb.ez.2f	AGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	40,0	58,2
ecb.ez.2r	CCTTCGATCAAAACTTTTGTTTG	34,8	58,9
ecb.ez.3f	GATCATAACAATAATCCAGACACAAAC	34,6	57,2
ecb.ez.3r	CGGATGAATTTGTCATTTTACG	36,4	57,9

Es wird vorgeschlagen, dass dieses Primerset bei Begleituntersuchungen zu *Bt*-Mais angewendet werden kann, um bei Magen/Darm-Untersuchungen zur Nahrungsprävalenz bspw. bei Vögeln oder Insekten, wie z. B. bei den Marienkäfern (Coccinellidae), Schwebfliegenlarven (Syrphidae) oder der Blumenwanze *Orius insidiosus* (REH, 1985; ATTIA, 1985), *O. nubilalis* zu identifizieren. Dafür müssten jedoch noch weitere Validierungen zur PCR erfolgen.

Fazit: Für die Entwicklung von spezifischen Primern zur Differenzierung der E- und Z-Rasse waren die Sequenzunterschiede im ITS-1-Fragment zu gering.

3.5 Populationsgenetische Analysen der mit *O. nubilalis*-assoziierten Darmmikroflora mittels T-RFLP

O. nubilalis beherbergt im Darm verschiedene Arten von Mikroorganismen, zu denen auch Bakterien gehören. Mit Hilfe der T-RFLP können genetische Fingerabdrücke einer komplexen Lebensgemeinschaft, wie der von Bakterien, erstellt werden. Aus diesen sollte untersucht werden, ob ein möglicher Zusammenhang zwischen den Bakterienarten und den *O. nubilalis*-Populationen existiert, der standort- oder ernährungsbedingt sein könnte. So wäre es möglich die in der vorliegenden Arbeit definierten Gruppen von lokalen Populationen durch eine ähnliche Darmflora von *O. nubilalis* zu bestätigen.

In einer Voruntersuchung wurden zwei verschiedene Primerpaare getestet, die jeweils einen anderen Teilbereich der 16S rDNA amplifizierten. Das Primerpaar 799f und 1492r analysiert den hinteren Bereich der 16S rDNA und amplifiziert ein Fragment von 735 bp. Dieser Bereich zeigte ein größeres Fragmentspektrum als das Primerpaar 8f und 926r (LIU et al., 1997), welches den vorderen Bereich der 16S rDNA beschreibt. Für die nachfolgenden Untersuchungen wurde deshalb mit dem Primerpaar 799f und 1492r gearbeitet. Die Abb. 52 zeigt die unterschiedlichen Primerbindungsstellen der zwei Primerpaare auf der 16S rDNA.

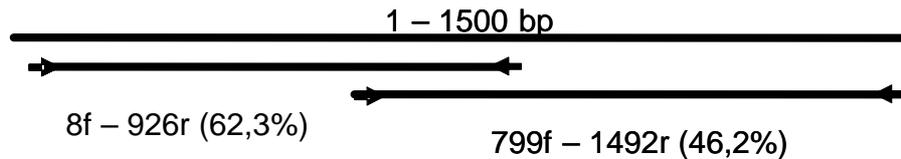


Abb. 52: Bindung der beiden Primerpaare 8f und 926r bzw. 799f und 1492r auf der 16S rDNA (Angaben über die prozentuale Fragmentlänge in Bezug auf die Gesamtlänge von 1500 bp)

Bei der Restriktionsspaltung wurden die Enzyme TaqI und HhaI eingesetzt. Die DNA der verschiedenen Körperregionen wurden mit dem Enzym TaqI gespalten. Das Enzym HhaI zeigte ein höheres bakterielles Heterogenitätsspektrum als TaqI, das sich in der Anzahl der Fragmente ausdrückte. Daher wurde für die Analyse der acht lokalen *O. nubilalis*-Populationen mit dem Enzym HhaI gearbeitet.

DNA aus Kopf, Thorax und Abdomen der einen Larve sowie dem Darm einer anderen Larve zeigten nach der Spaltung mit dem TaqI-Enzym ein einheitlich großes Fragment von 40 bp und bei der DNA von Thorax, Abdomen und Darm weitere größere Fragmente bis zu ca. 200 bp mit geringer Abundanz. Die Fragmentzahl nahm vom Kopf-DNA-Extrakt zu dem DNA-Extrakt des Abdomens und des Darmbereiches erwartungsgemäß zu (Abb. 53).

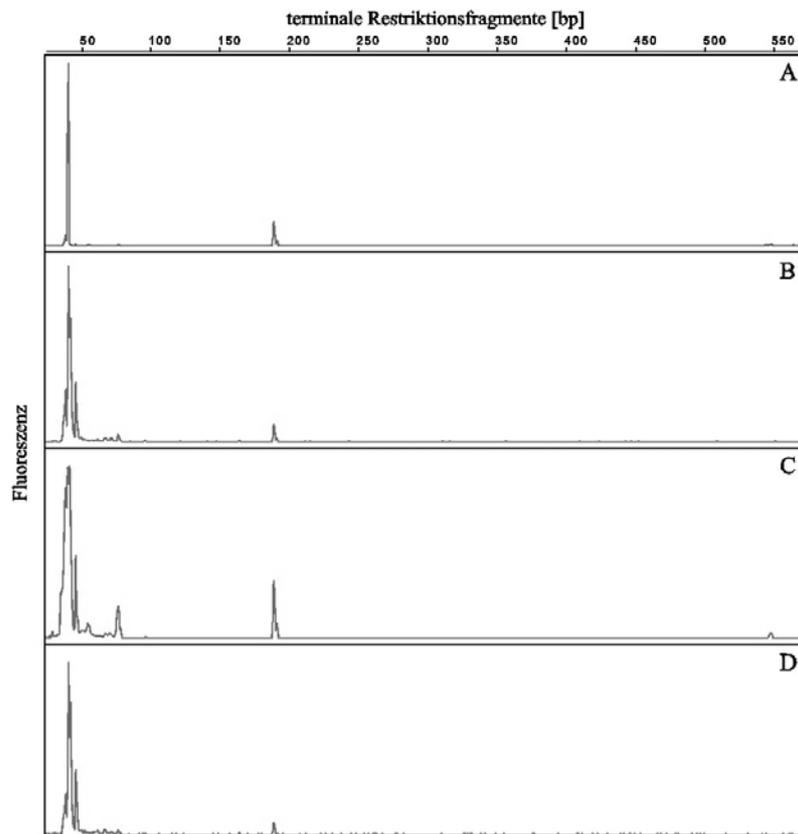


Abb. 53: T-RFLP von der mit den Larven von *O. nubilalis* assoziierten bakteriellen 16S rDNA aus verschiedenen Larvenbereichen (A = Kopf, B = Thorax, C = extrahierter Darm, D = Abdomen)

Bei der Prüfung der 20er-DNA-Extrakte auf das Bakterienspektrum wurden die sechs lokalen Feldpopulationen Oderbruch, Halle, Niedernberg, Hessisches Ried, Bonn und Pocking und zwei Laborpopulationen Karlsruhe und Freiburg untersucht. Die spezifische PCR ergab eine Bande von ca. 735 bp. Aus den terminalen Restriktionsfragment (T-RF)-Profilen wurde ein Diagramm erstellt, das neben der Diversität die relative Abundanz der Bakterienarten darstellt (Abb. 54). Die relative Abundanz kennzeichnet die Anzahl der Individuen (Individuendichte) einer oder mehrerer Art(en) bezogen auf eine bestimmte Flächen- oder Volumeneinheit. Für die Darstellung der relativen Abundanz wurden die Fragment-Peakhöhen verwendet, die durch den Quotienten aus jeder Fragment-Peakhöhe zur Gesamt-Peakhöhe aller Fragmente einer Lokalpopulation berechnet wurden (DUNBAR et al., 2001). Bei dieser Berechnung wurden unspezifische Fragmente < 50 bp nicht berücksichtigt und alle Fragmente, die kleiner als 1 % zu der Gesamtfragment-Peakhöhe waren, wurden eliminiert. Somit sind unbedeutende Fragmente, die möglicherweise durch das T-RF-Profil entstanden sind, nicht in die Bewertung eingeflossen.

Zwischen allen Feld- und Laborpopulationen konnte ein überwiegend einheitliches Bakterienspektrum aufgezeigt werden (Abb. 54). Nach der Spaltung des Enzyms HhaI erzielten alle DNA-Extrakte ein einheitliches starkes Fragment mit einer Größe von 381 bp. Außerdem wurden bei allen Lokalpopulationen fünf kleine Fragmente mit einer Größe von 51 bp, 69 bp, 71 bp, 398 bp und 407 bp ermittelt (Abb. 54). Die Original-Elutionsdiagramme befinden sich im Anhang 5.

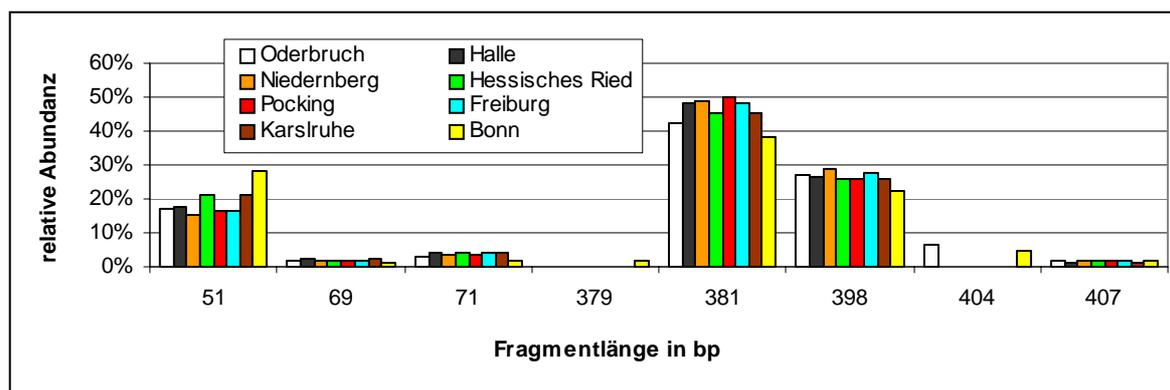


Abb. 54: Diagramm der T-RF-Profilen des 693 bp großen Fragments der bakteriellen 16S rDNA in der Template-DNA von *O. nubilalis* (8 Standorte) nach der Spaltung mit dem mit dem Restriktionsenzym HhaI

Neben den sechs einheitlich erzeugten Fragmenten wurden bei den Standorten Oderbruch und Bonn noch ein zusätzliches Fragment mit einer Länge von 404 bp ermittelt. Die Lokalpopulation aus Bonn zeigte außerdem noch ein Fragment von 379 bp.

Bei den zwei Standorten Oderbruch und Halle wurde eine echte Wiederholung mit einer zweiten 20er-Gruppe durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit der Methode zu analysieren. Bei beiden Oderbruch-Populationen ist ein identisches Spektrum erzielt worden, das somit auf eine gute Reproduzierbarkeit der Methode hinweist. Die beiden Lokalpopulationen aus Halle zeigten jedoch einige geringe Unterschiede, die bei der Probe 2 auf eine geringe Ausbeute der PCR-Produkte zurückzuführen ist. Die Auswertung deutet bei der Probe 2 von Halle auf eine geringe Menge PCR-Produkt, die bei dieser T-RFLP-Untersuchung zum Einsatz kam (Vergleich: 1. Probe Gesamt-Fragment-Peakhöhe 9032; 2. Probe 1756 im Anhang 5).

Fazit: Mit Hilfe bakterienspezifischer Primer und der T-RFLP konnte in den DNA-Extrakten von *O. nubilalis* bakterielle DNA von verschiedenen Arten nachgewiesen werden. Durch das überwiegend einheitliche Bakterienspektrum bei allen Lokalpopulationen von *O. nubilalis* bestand keine Beziehung zwischen den Bakteriengesellschaften des Darmes und der Herkunft der *O. nubilalis*-Population.

4 DISKUSSION

4.1 Optimierung der RAPD-PCR für populationsgenetische Erhebungen

Unter dem Programm „BioMonitor“ wurde vom BMBF das Projekt zur Untersuchung der genetischen Variabilität von *O. nubilalis* zwischen verschiedenen deutschen Populationen über einen Zeitraum von 1999 bis 2001 gefördert. Die genetische Variabilität wurde mit Hilfe der RAPD-PCR ermittelt. Diese eignet sich gut zur Unterscheidung von genetisch ähnlichen Individuen (WILLIAMS et al., 1993) und wird sowohl zwischen Arten als auch innerhalb einer Art zwischen Populationen (BLACK, 1993; HARDYS et al., 1992) eingesetzt. Eigene RAPD-Untersuchungen innerhalb der Familie Pyralidae mit *O. nubilalis*-Populationen und den Außengruppen *Plodia interpunctella* und *Ephestia kuehniella* zeigten eine gute Separierung dieser Arten. Ähnliches wurde bei AFLP-Untersuchungen von Populationen des Schwammspinners *Lymantria dispar* beobachtet, bei denen die gleichen Außengruppen eingesetzt wurden (REINICKE, 1998). Auch bei RAPD-Untersuchungen der Weißen Fliege *Bemisia tabaci* zeigten die Populationen dieser Art eine bedeutend höhere genetische Ähnlichkeit als zu der Art *Trialeurodes vaporariorum*, die als Außengruppe eingesetzt wurde (WU et al., 2002). Die RAPD-PCR fordert ein hohes Maß an Standardisierungen und internen Kontrollen, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten (ELLSWORTH et al., 1993). Hierzu gehören u. a. die Parameter Extraktion, dNTPs, Primer, Konzentration der Ziel-DNA und Polymerase, die in den folgenden Abschnitten diskutiert werden.

4.1.1 Extraktion von DNA

Die ideale Extraktionsmethode sollte ein geringes Ausgangsmaterial benötigen, kostengünstig und für viele nachfolgenden Anwendungen, wie PCR, RFLP u. a., anwendbar sein (REYES et al., 1997). Daher wurde die Dellaporta-Methode ausgewählt, die mit der Mikroextraktionsmethode für pflanzliche und tierische DNA von REYES et al. (1997) vergleichbar ist. Die ursprünglich für Pflanzen-DNA entwickelte Extraktionsmethode nach DELLAPORTA et al. (1983) z. B. für Wachholder (ADAMS et al., 1993) ist ein häufig angewandtes Verfahren zur DNA-Extraktion verschiedener Organismen, z. B. von Nematoden (PASTRIK et al., 1995) und von Insekten (GRASER et al., 1995). Die extrahierte *O. nubilalis*-DNA bestand ausschließlich aus hochmolekularer DNA. Im Gegensatz zu der *O. nubilalis*-DNA enthielt die Nematoden-DNA auch niedermolekulare, fragmentierte DNA (PASTRIK, 1995).

Es gibt Hinweise darauf, dass mitextrahierte RNA negative Auswirkungen auf die Amplifikation von RAPD-Mustern besitzt (YOON et al., 1993; ELLSWORTH et al., 1993). Nach Vermutungen von YOON et al. (1993) könnte RNA als Primer fungieren. In eigenen RAPD-Untersuchungen konnten ohne Einsatz eines Primers keine Banden amplifiziert werden, obwohl RNA enthalten war. Allerdings ist es weiterhin denkbar, dass sich einzelne RNA-Stränge an die DNA binden und somit die Anlagerung von Primern verhindern. Diese Tatsache hätte jedoch nur Auswirkungen auf die Menge der PCR-Produkte. Als weitere Komplikation wurde vermutet, dass große Mengen an RNA Mg-Ionen an sich binden können (ROCHE, 2002), die damit der PCR nicht mehr zur Verfügung stehen. Durch die in dieser Arbeit eingesetzte hohe Magnesium-Konzentration von 4 mM und eine ausreichende Amplifizierung der RAPD-Muster kann dieses Argument vernachlässigt werden. Es ist auch vorstellbar, dass andere Kationen, z. B. vom Puffer (K⁺), sich bevorzugt an die RNA heften und damit ausreichend Mg-Ionen für die PCR vorhanden sind. In unseren Untersuchungen wurde auf eine RNase Behandlung verzichtet, da auch aus anderen RAPD-Arbeiten, z. B. der Nematodenarbeit von PASTRIK (1995), Vergleiche von Behandlungen mit/ohne RNase vorlagen und in diesen gleiche RAPD-Muster erzielt wurden. Damit konnten Untersuchungen von YOON et al. (1993) nicht bestätigt werden, die eine Verbesserung der RAPD-Ergebnisse durch RNase-Behandlung während der Extraktion beschrieben. DERAGON & LANDRY (1992) zeigten, dass eine DNA-Extraktion mit CsCl-Reinigung, d. h. eine Eliminierung der RNA, zu keiner Verbesserung der RAPD-Ergebnisse führte. Gleichzeitig ist darauf hinzuweisen, dass diese Arbeit eine Status quo-Analyse der genetischen Ähnlichkeiten von *O. nubilalis* darstellt. Damit wird die Möglichkeit geschaffen, einen genetischen Vergleich zwischen Tieren vor und nach einem Selektionsdruck durch den Anbau von *Bt*-Mais zu erhalten.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Extraktion nach der Dellaporta-Methode mit jederzeit verfügbaren Substanzen und Materialien eine konstante und ausreichende Isolierung von *O. nubilalis*-DNA gewährleistet.

4.1.2 Optimierung der Reaktionsbedingungen in der RAPD-PCR

Die in dieser Arbeit durchgeführten Optimierungsschritte für Primer, dNTPs, Magnesium und Polymerasen folgten den Angaben von WILLIAMS et al. (1993); BLACK (1993); ELLSWORTH (1993); COBB & CLARKSON (1994); BASSAM et al. (1992); MEUNIER & GRIMONT (1993) und DEVOS & GALE (1992). Da nach MEUNIER & GRIMONT (1993) die RAPD-PCR nur dann eine zuverlässige Methode ist, wenn genau definierte Bedingungen

konstant eingehalten werden und keine verschiedenen Thermocycler benutzt werden, wurden alle PCR-Reaktionen mit dem gleichen Thermocycler durchgeführt.

a) Magnesium

Die Magnesium-Konzentration beeinflusst das RAPD-Muster, indem sie die Bindungsaffinität der Primer, die Aktivität und Spezifität der Polymerase, die Trennung der Stränge bei der Denaturierung und die Bildung von Primer-Artefakten beeinflusst. In eigenen PCR-Optimierungen konnten bei einer Konzentration < 3 mM nur wenige Banden amplifiziert werden, wohingegen höhere Konzentrationen die Bildung größerer Banden ab 1 300 bp begünstigte. COBB & CLARKSON (1994) sowie DEVOS & GALE (1992) gaben ebenfalls an, dass sich bei niedrigen Magnesium-Konzentrationen die Anzahl der Amplifikationsprodukte reduziert. Allerdings führten zu hohe Konzentrationen bei ihnen zu einer Vielzahl nicht auswertbarer Banden. Die in dieser Arbeit verwendete Magnesium-Konzentration von 4 mM sorgte für eine optimale Aktivität der Polymerase (Stoffelfragment) und wurde auch in anderen PCR-Arbeiten, z. B. bei *O. nubilalis* (PORNKULWAT et al., 1998) oder beim Schwammspinner *Lymantria dispar* (GRASER et al., 1995), eingesetzt, die ebenfalls mit dem Stoffelfragment arbeiteten. GAWEL & BARTLETT (1993) verwendeten hingegen bei den Untersuchungen von Biotypen der Weißen Fliege *Bemisia tabaci* eine geringere Magnesium-Konzentration von 3 mM. Bei entomologischen RAPD-Untersuchungen mit anderen Polymerasen werden häufig Magnesium-Konzentrationen von 0,5 mM – 3,5 mM eingesetzt.

b) dNTPs

Die optimale dNTP-Konzentration hängt von der Magnesium- und der Primer-Konzentration ab. Eine zu hohe Konzentration reduziert freie Magnesium-Ionen und beeinflusst damit die Polymeraseaktivität und das Primerannealing. Die Vorversuche zeigten, dass im Bereich von 150 μ M – 250 μ M kaum Veränderungen in den RAPD-Mustern auftraten. Die Konzentration von 100 μ M führte zu einer geringen Menge amplifizierter DNA und die höchste Konzentration von 300 μ M zeigte Intensitätssteigerungen besonders für Banden kleiner als 800 bp. Auch in der Arbeit von WILLIAMS et al. (1993) wurden bei geringen dNTP-Konzentrationen < 100 μ M nur schwache Banden amplifiziert. Andererseits zeigten COBB & CLARKSON (1994) bei hohen dNTP-Konzentrationen eine zunehmende Amplifikation von nicht trennbaren Banden.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete dNTP Konzentration von 200 μ M wurde auch in anderen RAPD-Arbeiten, z. B. bei Heuschrecken (*Melanoplinae* spp. – CHAPACO et al.,

1992), bei Weißen Fliegen (*Bemisia tabaci* – DE BARRO & DRIVER, 1997) und Läusen wie der Sitkatfichtenlaus (*Elatobium abietinum* – SIGURDSSON et al., 1999) oder der Grünen Gurkenlaus (*Aphis gossypii* – VANLERBERGHE-MASUTTI & CHAVIGNY, 1998) und beim Schwammspinner (*Lymantria dispar* – REINEKE, 1998), unabhängig vom Polymerase-Typ, verwendet.

c) RAPD-Primer

Primerauswahl in Bezug auf die Primeranzahl

In der vorliegenden Arbeit wurden von insgesamt 30 getesteten Decamer-Primern diejenigen 20 Primer für die populationsgenetischen Untersuchungen ausgewählt, die eine hohe Anzahl an auswertbaren Banden mit einem geringen Hintergrundrauschen lieferten. Den Vorschlag von BOWDITCH et al. (1993) eine große Anzahl an RAPD-Primern zu testen, um jene auszuwählen, die die meisten gut auswertbaren Banden produzieren, wurde in einigen Arbeiten umgesetzt. So sind bei populationsgenetischen RAPD-Untersuchungen von der Sitkatfichtenlaus *Elatobium abietinum* 27 von 40 RAPD-Primern (SIGURDSSON et al., 1999), von der Stechmücke *Aedes aegypti* und *A. formosus* 3 von 40 Primern, von der Reblaus *Daktulosphaira vitifoliae* (DOWNIE, 2000) 17 von 30 Primern, von *Brassica napus* 6 von 100 Primern (MAILER et al., 1994) und von PORNKULWAT et al. (1998) 10 von 120 Primern für alle *O. nubilalis*-Larven der drei amerikanischen Ökotypen ausgewählt worden. In den Anwendungen der RAPD-PCR variiert die Primeranzahl in der Literatur erheblich. Diese reicht abhängig von der Versuchsfrage von einem Primer, z. B. bei der Identifikation von A- und B-Biotypen der Weißen Fliege *Bemisia tabaci* (MARTINEZ et al., 2000), bis zu 40 Primern bei den Populationen des Schwammspinners *Lymantria dispar* (GRASER et al., 1995).

Primerauswahl in Bezug auf den Polymorphiegrad der Primer

Bei der Primer-Auswahl sollte ein möglichst hoher Polymorphiegrad bevorzugt werden, der u. a. durch einen hohen GC-Gehalt von 60 % – 90 % erreicht werden sollte (CLARK & LANIGAN, 1993; WILLIAMS et al., 1993). In dieser Arbeit konnte zwischen dem GC-Gehalt (15 Primer 60 %, drei Primer 70 % und zwei Primer 80 %) und der Bildung polymorpher Banden keine Beziehung hergestellt werden. So zeigten die beiden Primer Roth 180-08 und Roth 280-08 mit einem GC-Gehalt von 80 % einen gleich großen Polymorphismus wie die anderen Primer mit geringeren GC-Gehalten. Andererseits wird im Beipackzettel von Perkin Elmer darauf hingewiesen, dass der GC-Gehalt ca. 50 % betragen sollte, um die Spezifität zur Template-DNA zu maximieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden pro Primer ca. 9 Banden ausgewertet. Demgegenüber gibt WILLIAMS et al. (1993) als Durchschnittswert nur 5,3 amplifizierte Banden pro RAPD-Primer an. Neben den in der vorliegenden Arbeit ausgewerteten Banden wurde noch eine bedeutend höhere Anzahl an Banden amplifiziert, aber nicht für die Auswertung herangezogen. Diese nicht auswertbaren Banden hatten gegenüber den auswertbaren Banden eine geringe Intensität und/oder ein starkes Hintergrundrauschen. In der Arbeit von HERING (1997) wird gegenüber den in dieser Arbeit verwendeten Decamer-Primern darauf hingewiesen, dass bei längeren Primern von 15 bp – 21 bp durchschnittlich mehr Banden amplifiziert werden.

Primerkonzentration

Die Primerkonzentration kann ebenfalls einen erheblichen Einfluss auf die Ausbeute haben. Die Prüfung des getesteten Konzentrationsbereiches orientierte sich an der Bildung langer Amplifikationsprodukte, die wie ELLSWORTH et al. (1993) angeben, durch eine geringe Primerkonzentration von 0,1 μM – 0,4 μM erreicht wird. Die in dieser Arbeit ausgewählte Primer-Konzentration von 0,2 μM befindet sich in dieser empfohlenen Konzentrationsspanne. Die Schmelztemperatur (T_m) berechnet sich aus dem GC-Gehalt des Primers und gibt die Temperatur an, bei der 50 % der Oligonukleotide gebunden sind.

Annealing-Temperatur

Als optimale Annealing-Temperatur wird eine um 5 °C unter der T_m liegenden Temperatur empfohlen. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer besitzen eine theoretische T_m von 32 °C – 36 °C (Tab. 5). Da eine große Temperaturspanne zwischen Denaturierung und Annealing und eine T_m weit unter 40 °C die Bildung nicht auswertbarer Banden fördert, ist die theoretische T_m nicht mit der praktischen T_m zu vereinbaren. Die in der vorliegenden Arbeit ausgewählte Annealing-Temperatur von 38 °C befindet sich in einem Bereich, der im Vergleich zu anderen entomologischen Arbeiten von 35 °C (Parasitoide *Eretmocerus mundus*, *Encarsia formosa* der Weißen Fliege *Bemisia tabaci* - KIRK et al., 2000; Stechmücke *Anopheles spp.* – WILKERSON et al., 1993; Weiße Fliege *Bemisia tabaci* – LIMA et al., 2000 und Koniferen *Pseudotsuga menziesii* und *Picea glauca* – CARLSON et al., 1991) bis 40 °C (Weiße Fliege – WU et al., 2002; DE BARRO & DRIVER, 1997) gut abgedeckt wird.

d) Konzentration der Ziel-DNA (Template)

Für die Erzielung von konstanten RAPD-Mustern ist neben den Optimierungen der PCR-Komponenten eine standardisierte DNA-Menge unumgänglich, die von ELLSWORTH et al. (1993) für alle RAPD-Analysen empfohlen wird. Für die Ermittlung dieser optimalen Template-Menge wurden zwei identische Untersuchungen durchgeführt, die zu zwei unterschiedlichen Ergebnissen führten. Während im ersten Versuch bei Konzentrationen zwischen 50 ng und 0,4 pg eine kontinuierliche Abnahme der größeren Banden und eine qualitative Zunahme der kleinen Banden sichtbar wurden, trat im zweiten Versuch ein erratisches RAPD-Muster unter 50 pg auf. Dieser Unterschied könnte damit erklärt werden, dass im zweiten Versuch Nichtziel-DNA im Verdünnungsmedium Wasser oder in den PCR-Reagentien enthalten war, welches in Konkurrenz zu der Template-DNA trat. Bei der Konzentrationsabnahme der Ziel-DNA ist ab 50 pg ein Punkt erreicht worden, bei dem die Nichtziel-DNA für die Amplifikation ihrer Sequenzabschnitte bevorzugt wurde. Eine starke Veränderung des RAPD-Musters bei verschiedenen DNA-Konzentrationen wurde auch in der Nematoden-Arbeit von PASTRIK (1995) beschrieben. Er erhielt im Bereich von 20 ng bis 0,5 mg konstante RAPD-Muster. Ober- und unterhalb dieses Bereiches traten erhebliche Änderungen im RAPD-Muster auf. Im Vergleich dazu kann im ersten Versuch der vorliegenden Arbeit von einem PCR-Ansatz ausgegangen werden, der absolut frei von Nichtziel-DNA war. In diesen eigenen zwei Versuchen zeigte sich, dass der Konzentrationsbereich von 20 x mehr oder weniger als 2 ng bei einem Reaktionsmix von 25 µl (0,08 ng/µl) konstante RAPD-Muster lieferte und daher für alle PCR-Reaktionen eingesetzt wurde. In anderen RAPD-Arbeiten mit Insekten-DNA wurden auch z. T. geringere aber jedoch meist höhere DNA Mengen verwendet. Bei der Käferart *Naupactus spp.* wurde eine ähnliche DNA-Konzentration von 0,1 ng/µl eingesetzt (HARDWICH et al., 1997). Eine 25fach höhere DNA-Menge wurde bei den Heuschrecken zweier Subfamilien der Acrididae (CHAPCO et al., 1992) und der Sitkatfichtenlaus *Elatobium abietinum* (SIGURDSSON et al., 1999) gefunden und eine 50-fache beim Schnabelkerfe *Marchalina hellenica* (MARGARITOPOULOS et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden auch bei einer 25fach höheren Konzentration gut voneinander trennbare Banden erhalten. Demgegenüber wiesen WILLIAMS et al. (1993) darauf hin, dass hohe DNA-Konzentrationen zu unklaren, verschmierten Banden führen können. Ein umgekehrtes Verhältnis wurde bei der Reblaus *Daktulosphaira vitifoliae* sichtbar, bei der qualitativ bessere Banden bei einer höheren Konzentration von 1,5 ng/µl DNA gegenüber 1 ng/µl entstanden (DOWNIE, 2000).

e) Polymerase

Bei der Auswahl der Polymerase wurde von Anfang an das Stoffelfragment der Taq-DNA-Polymerase (Applied Biosystems) favorisiert, da auch in anderen Arbeiten zur RAPD-PCR gute Erfahrungen mit dieser Polymerase erzielt wurden und viele Vorteile gegenüber anderen Polymerasen bestehen. So wurde bspw. bei dem Nematoden *Meloidogyne chitwoodi* (HEGEMANN, 1997), beim Schwammspinner *Lymantria dispar* (GRASER et al., 1995) und bei *O. nubilalis* (PORNKULWAT et al., 1998) ebenfalls das Stoffelfragment eingesetzt.

Das Stoffelfragment wurde durch die folgenden Vorteile favorisiert:

Das Stoffelfragment besitzt eine zweifach höhere Thermostabilität gegenüber der AmpliTaq-Polymerase (SOBRAL & HONEYCUTT, 1993), die sich nach über 35 Zyklen auch bei der finalen Extention durch eine hohe Aktivität auszeichnet. Diese Eigenschaft ist ebenfalls hilfreich, wenn wie in der vorliegenden Arbeit mit unbekannter DNA-Sequenz gearbeitet wird, die möglicherweise Sekundärstrukturen und einige G/C-reiche Abschnitte besitzt und dafür höhere Denaturierungstemperaturen notwendig sind (ANONYMUS, 2001b). Nach den Voruntersuchungen in dieser Arbeit stellte sich jedoch heraus, dass eine allgemein verwendete Denaturierungstemperatur von 92 °C ausreichend ist. Weiterhin zeigten Untersuchungen von BASSAM et al. (1992), dass bei Magnesium-Konzentrationen von 2 mM – 8 mM nahezu einheitliche Muster mit dem Stoffelfragment aufgezeigt werden konnten. Dies kann eine Ursache dafür sein, dass bei den Untersuchungen von SOBRAL & HONEYCUTT (1992) mit *Saccharum spontaneum* (Gramineae) von 41 verwendeten Primern (mit verschiedenen optimalen Magnesium-Konzentrationen) die AmpliTaq-Polymerase bei 30 %, die Pfu-Polymerase bei 34 % und das Stoffelfragment bei nur 2,8 % der Primer keine Amplifikationsprodukte lieferten.

Das Stoffelfragment zeigte in der Arbeit von SOBRAL & HONEYCUTT (1993), dass es eine höhere Anzahl an Bindungsplätzen und Polymorphismen pro Primer gegenüber der AmpliTaq hervorbringt. Somit können mehr informative Sequenzabschnitte der unbekanntes DNA gesammelt werden. Dies bestätigte sich auch in der vorliegenden Arbeit, bei der jeder Primer zwischen 53 % und 100 % auswertbare polymorphe Banden erzeugte (Tab. 34).

Weiterhin zeichnet sich das Stoffelfragment durch eine zehnfach geringere Prozessivität gegenüber der AmpliTaq-Polymerase aus. Das bedeutet, dass in einer größeren Zeitspanne eine geringere Anzahl an Nukleotiden angefügt werden, bis die Polymerase von der DNA-

Kette abdissoziiert (MÜHLHARD, 2002) und somit kürzere Produkte gegenüber anderen Polymerasen liefert (BASSAM et al., 1992). Dadurch stehen die für die RAPD-PCR interessanten und typischen DNA-Bereiche von 100 bp – 1000 bp (ANONYMUS, 2001b) mehr Polymerase-Moleküle zur Verfügung.

SOBRAL & HONEYCUTT (1992) vermuten, dass die Sensibilität für Fehlpaarungen zwischen Primer und Template beim Stoffelfragment größer ist als bei der AmpliTaq- und Pfu-Polymerase. Dadurch kann eine fehlerhafte Basenpaarung (Mismatching) der Primer durch die Polymerase erkannt werden und zu einem Synthesestopp führen. Dies trägt somit dazu bei, dass seltene mutierte Allele von unspezifischen Primerbindungen unterschieden werden können (LAWYER et al., 1993). Kritisch zu betrachten ist, dass das Stoffelfragment keine Exonucleaseaktivität (LAWYER et al., 1993) und daher keine Korrekturfunktion besitzt.

In den Voruntersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden das Stoffelfragment und die AmpliTaq-Polymerase mit und ohne Q-Solution getestet. Dabei zeigte sich, dass mit der Q-Solution die AmpliTaq bessere Amplifikationsprodukte lieferte als das Stoffelfragment und ohne Q-Solution umgekehrte Verhältnisse bestanden. Auch GAWEL & BARTLETT (1993) beobachteten - allerdings ohne Q-Solution - bei der Weißen Fliege *Bemisia tabaci*, dass die Polymerasen AmpliTaq und Stoffelfragment ein unterschiedliches RAPD-Muster produzieren. Da die Q-Solution ein undeclaredes PCR-Additiv ist, das von den Firmen evtl. zukünftig nicht mehr vertrieben wird und somit für spätere Vergleichsuntersuchungen nicht mehr zur Verfügung steht, wurde auf den Einsatz der Q-Solution verzichtet.

Die in der vorliegenden RAPD-Arbeit ausgewählte optimale Polymerase-Konzentration von 0,2 U/µl findet sich auch in anderen Literaturarbeiten wieder. So geben z. B. BASSAM et al. (1992) bei den zwei Bakterienarten *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* an, dass bei Konzentrationen zwischen 0,2 U/µl und 0,4 U/µl klare und konstante RAPD-Muster mit dem Stoffelfragment entstanden. RAPD-Arbeiten über den Schwammspinner *Lymantria dispar* (GRASER et al., 1995) und über Nematoden (PASTRIK, 1995) wurden mit der gleichen Konzentration von 0,2 U/µl Stoffelfragment durchgeführt.

4.1.3 PCR-Verunreinigungen mit Nichtziel-DNA

PCR-Verunreinigungen können durch Kontaminationen der verwendeten Chemikalien und/oder durch die Luft (Aerosole) entstehen. Obwohl stets eine saubere Arbeitsweise angestrebt wurde, können dennoch unbeabsichtigt Verunreinigungen nicht völlig

ausgeschlossen werden. Durch PCR-Ansätze ohne Ziel-DNA konnten die infolge von Verunreinigungen amplifizierte Banden nach Anzahl und Größe im Vergleich zu den *O. nubilalis*-Banden ausgewertet werden (Tab. 23). In der vorliegenden Arbeit wurden in 60 % aller durchgeführten PCR-Reaktionen DNA-Verunreinigungen in unterschiedlichster Stärke amplifiziert. Die Herkunftsquellen der PCR-Verunreinigungen mit Nichtziel-DNA konnten nicht ermittelt werden. Eine Kontamination durch PCR-Reagenzien, die über verschiedene Anbieter bezogen wurden, ist nicht auszuschließen. Eine häufige Verunreinigung von PCR-Reagenzien stellt die Polymerase dar. Wie BÖTTGER (1990) formulierte, wird die „natürliche“ Kontamination der Taq-Polymerase besonders durch den Einsatz von universellen Primern aufgedeckt. MEUNIER & GRIMONT (1993) gaben an, dass jede von ihnen getestete Taq-Polymerase mit Nichtziel-DNA kontaminiert war. Diese Möglichkeit ist auch bei der Polymerase Stoffelfragment nicht auszuschließen. Da im Puffer kein Rinderserumalbumin vorhanden war, das häufig mit DNA kontaminiert ist (ROLF et al., 1992 zitiert in: HERING, 1997), wird die Kontamination des Puffers als gering eingestuft. Negativ-Kontrollen finden in vielen entomologischen RAPD-Arbeiten Anwendung, so z. B. bei der Heuschrecke *Melanoplinae* spp. (CHAPCO et al., 1991), bei der gleich drei verschiedene Negativ-Kontrollen getestet wurden. Neben dem Fehlen von Template-DNA wurde auch der Nichteinsatz von Primer und Polymerase untersucht und bei allen drei Negativ-Kontrollen keine Amplifikationsprodukte erhalten. Es ist allerdings fraglich, welcher Sinn bei den letzten beiden Arten der Negativ-Kontrollen besteht. In keiner bekannten Arbeit wurde auf eine Amplifizierung von Nichtziel-DNA hingewiesen, die bei RAPD-Primern nie auszuschließen ist.

4.1.4 Reproduzierbarkeit der RAPD-Muster

Trotz der Kritik aus anderen RAPD-Arbeiten (SILVIA & RUSSO, 2000; BLACK, 1993) wurde meist eine gute Reproduzierbarkeit der RAPD-Muster innerhalb eines PCR-Ansatzes und zwischen verschiedenen PCR-Ansätzen erzielt. In der vorliegenden Arbeit ist innerhalb eines PCR-Ansatzes die Reproduzierbarkeit der RAPD-Muster durch eine zweite Probe der gleichen Template-DNA überprüft und bestätigt worden. Die gute Reproduzierbarkeit zwischen zwei PCR-Ansätzen wurde durch die DNA der zwei Außengruppen über einen Zeitraum von zwei Jahren aufgezeigt. Kontrollwiederholungen der gleichen DNA-Probe in einem zweiten PCR-Ansatz werden auch in anderen RAPD-Arbeiten durchgeführt, so bei der Grünen Gurkenlaus *Aphis gossypii* (VANLERGERGHE-MASUTTI & CHAVIGNY, 1998) und bei der Schmetterlingsart *Boloria aquilonaris*

(VANDEWOESTIJNE & BAGUETTE, 2002). Auch bei den Schwammspinner-Populationen wurden reproduzierbare RAPD-Muster erhalten (REINICKE, 1998). WILKERSON et al. (1993) weisen darauf hin, dass die RAPD-Muster auf Reproduzierbarkeit überprüft werden müssen, bevor die Primer für die Auswertung herangezogen werden. Die gute Reproduzierbarkeit der RAPD-Muster in der vorliegenden Arbeit ist auch darauf zurückzuführen, dass kein Wechsel von Thermocyclern, Polymerasen u. a. vorgenommen wurde.

4.2 Repräsentativität einer Populationsstichprobe

Der Anspruch einer Stichprobe liegt darin, dass mit einer möglichst geringen Anzahl an Individuen die Population ausreichend charakterisiert wird und ein Einfluss von Nichtziel-DNA anderer Organismen auf die RAPD-Muster der Ziel-DNA auszuschließen ist. Wenn in Voruntersuchungen ein Einfluss von Nichtziel-DNA auf die RAPD-Muster der Ziel-DNA nachgewiesen wird, dann muss deren Konzentration durch selektive Extraktion (gewebe- oder organspezifisch) minimiert werden.

4.2.1 Verunreinigungen der Template-DNA

4.2.1.1 Mais-DNA

Zu den Verunreinigungen, die in der *O. nubilalis*-DNA auftreten können, zählen die Mais-DNA und die Mikroben-DNA. Für das Vorhandensein von Mais-DNA wurde eine spezifische PCR durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass weder bei den Larven vom Feld noch vom Labor Mais-DNA nachgewiesen werden konnte. Daraus kann gefolgert werden, dass die im Herbst auf den Maisfeldern gesammelten L5-Larven ihren Darm in Vorbereitung auf die Diapause bereits vollständig entleert hatten. Entgegen den Befunden von ENGEL (1971) zitiert in: BURGSTALLER (1974), bei dem Raupen bis zum Beginn des Winters weiterfraßen, zeigten Untersuchungen von BURGSTALLER (1974), dass nach Darmpräparationen von 200 im Herbst gesammelten Larven keine Nahrungsreste gefunden wurden. Somit kam auch er zu dem Schluss, dass die Raupen im Freiland ihre Nahrungsaufnahme im Körnermais spätestens bis Anfang November beenden. Diese Schlussfolgerungen sind auch auf unsere Ergebnisse übertragbar, wenngleich die Larven für diese Arbeit auf der Stoppel des Silomaisfeldes im September eingebracht wurden. Bei L1-Larven, die in der vorliegenden Arbeit mit Mais gefüttert wurden, konnte die Mais-DNA gut nachgewiesen werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass in den

DNA-Extrakten von *O. nubilalis*, die weit vor der Diapause gesammelt werden, Mais-DNA vorhanden ist, die allerdings nicht zwangsläufig Störungen im RAPD-Muster verursachen muss. Störungen im RAPD-Muster sind erst ab einem bestimmten Verhältnis zwischen Nichtziel-DNA und Ziel-DNA zu erwarten. So zeigte HEGEMANN (1997) dass sich das RAPD-Muster von Nematoden-DNA ab einer 10 %igen Verunreinigung durch Kartoffel-DNA änderte. Bei dem Diätmedium für die Labor-Zucht (Darmstadt-Probe), das u. a. aus Maisgrieß bestand, kann nach den erhaltenen Ergebnissen davon ausgegangen werden, dass es keine intakte Mais-DNA enthielt.

4.2.1.2 Mikroben-DNA

Eine weitere Verunreinigung der Template-DNA war im Darm von *O. nubilalis* durch Mikroben-DNA, besonders von Bakterien, gegeben, da der Darm vor der Extraktion der Larven nicht entfernt wurde. In der vorliegenden Arbeit wurden RAPD-Untersuchungen mit Template-DNA vom Darm und aus anderen Körperteilen durchgeführt. Die Vermutung, dass die Körperbereiche des Magen-Darm-Traktes aufgrund der Mikroflora mehr RAPD-Banden amplifizierten als der Kopfbereich konnte nicht bestätigt werden. Somit war eine spezielle Präparation der L5-Larven von *O. nubilalis*, wie sie bei PORNKULWAT et al. (1998) durchgeführt wurde, nicht notwendig. Stattdessen produzierte die DNA des Kopfes primer- und individuenabhängig im höheren Basenpaarbereich (>1500 bp) zusätzliche Banden (1 bis 4 Banden). Da nach diesem Ergebnis nicht davon ausgegangen wurde, dass es sich bei den zusätzlichen RAPD-Banden im Kopfbereich um bakterielle DNA handelt, kann geschlussfolgert werden, dass die Amplifikation von größeren Abschnitten der Ziel-DNA von der DNA-Qualität beeinflusst wird. Die unterschiedliche DNA-Qualität kann von Enzymen verursacht werden, die im Darmbereich vorhanden sind und bereits bei der Extraktion eine DNA geringer Qualität (z. B. DNA-Scherung) liefern. Um einer möglichen Kontamination durch pflanzliche- oder tierische DNA zu entgehen, wurde in anderen Arbeiten über Lepidopteren, z. B. bei *Parnassius nomion* und *Parnassius bremeri* (ZAKHAROV, 2001) und bei den *O. nubilalis*-Untersuchungen an der RWTH Aachen mittels AFLP (pers. Mitt. SA EGLITZ, 2002), DNA aus dem Thorax adulter Tiere extrahiert. Auch beim Schwammspinner *Lymantria dispar* wurden aus unterschiedlichen Gewebeteilen (Kopf, Thorax, Abdomen, Flügel) von Imagines identische RAPD-Muster und keine zusätzlichen Banden im Kopfbereich erzeugt (REINEKE, 1998). Bei den Schmetterlings-Larven könnte, durch die große tägliche Aufnahme von pflanzlichen Produkten, eine größere Anzahl an verschiedenen Enzymen

und eine höhere Anzahl von Fremd-DNA vorhanden sein als bei Faltern, da diese kaum noch Nahrung zu sich nehmen.

Einen erheblich größeren Einfluss auf das RAPD-Muster können die in größerer Anzahl vorkommenden Endosymbionten in einigen Insektenarten ausüben. So leben in den Mottenläusen (Aleyrodina, Weiße Fliege), in Blattläusen (Aphidina) oder in anderen Insektenarten Endosymbionten im Mitteldarm oder in speziellen Organen (Mycetome). Kritisch anzumerken ist, dass in vielen RAPD-Arbeiten über diese Insektenarten eine mögliche Beeinflussung des RAPD-Musters durch Endosymbionten nicht untersucht wird. MARUTHI et al. (2001) geben an, dass Endosymbionten das RAPD-Muster beeinflussen, halten es aber für unwahrscheinlich, dass einige Nichtziel-Banden das ganze Ergebnis verändern können. HOMMEL & PACHOLSKY (1996) konnten in ihren Untersuchungen über das Blattlausgenom von *Acyrtosiphon pisum* nachweisen, dass Banden der Endosymbionten in der Misch-DNA amplifiziert werden. Sie schätzten den Anteil der Endosymbionten-DNA jedoch nicht über 5 % und kamen zu dem Schluss, dass die RAPD-Primer vor allem an der im Gemisch dominierenden Blattlaus-DNA ansetzen. Eine Reihe von Insektenarten kann weiterhin durch endoparasitisch lebende Insekten (Parasitoide) befallen sein, die z. B. bei Blattläusen erst nach dem 6.Tag der Parasitierung im RAPD-Muster zu erkennen sind (BLACK et al., 1992).

4.2.2 Zusammensetzung der Template-DNA

4.2.2.1 Einzeltiere

Eine *O. nubilalis*-Population setzt sich aus vielen Individuen zusammen. Eine Schätzung für das Oderbruch könnte wie folgt aussehen: Im Kerngebiet des Oderbruchs werden jährlich mindestens 5 000 ha Silo-, CCM- und Körnermais mit 50 000 bis 100 000 Pflanzen/ha angebaut. In den letzten Jahren wurde auf diesen Flächen häufig ein mittlerer *O. nubilalis*-Befall von mindestens 50 % beobachtet; daraus folgt eine Anzahl von 25 000 bis 50 000 überwinterrfähigen Larven/ha oder eine Population im Oderbruch von 125 bis 250 Mio. Larven. Für die Bestimmung der populationsgenetischen Ähnlichkeit von verschiedenen Befallsgebieten Deutschlands bestand die Schwierigkeit darin, eine repräsentative und handhabbare Anzahl an Individuen aus einer Population für die Extraktion auszuwählen. Dabei war zu berücksichtigen, dass sich die RAPD-Muster einerseits aus vielen populationspezifischen Banden und andererseits aus wenigen individuen- und artspezifischen Banden zusammensetzen. Für die populationsgenetischen

Untersuchungen können Einzeltier-DNA-Extrakte oder eine Poolung von mehreren Einzeltier-DNA-Extrakten herangezogen werden. Bei den DNA-Extrakten der Einzeltiere wurden aufgrund der hohen Heterogenität der individuellen RAPD-Muster nur wenige art- und populationsspezifische Banden erzeugt. Demgegenüber konnten HARDWICK et al. (1997) keine Unterschiede zwischen den Individuen innerhalb von zwei Käferarten der Gattung *Naupactus* feststellen. Im Dendrogramm der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund der hohen intraspezifischen Heterogenität keine eindeutige Zuordnung der fünf Einzeltiere zu ihren jeweiligen Standorten aufgezeigt. PORNKULWAT et al. (1998) hingegen konnten eine Zuordnung von fünf Einzeltier-DNA-Extrakten von *O. nubilalis* zu ihren jeweiligen Ökotypen (uni-, bi-, multivoltin) vornehmen. Im Unterschied zu PORNKULWAT et al. (1998), die zehn Primer einsetzten und 21 auswertbare mono- und polymorphe Banden amplifizierten, wurden in dieser Arbeit mit nur fünf Primern 97 mono- und polymorphe Banden erzeugt. Von den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten fünf Primern stimmten vier (OPA-07, OPB-01, OPF-11, OPF-03) mit denen von PORNKULWAT et al. (1998) überein. Da trotz der höheren Anzahl an ausgewerteten Banden keine eindeutige Zuordnung der Einzeltiere zu ihren jeweiligen Standorten hergestellt werden konnte, kann geschlussfolgert werden, dass bei der RAPD-PCR eine Analyse von Populationen mit großer genetischer Ähnlichkeit innerhalb eines Ökotyps mit Einzeltieren schwer durchführbar ist. Wie jedoch Untersuchungen zwischen Populationen der Z- und E-Rasse von MEISE (pers. Mitt., 2003) zeigten, war ab einer Anzahl von fünf Primern keine, aber schon bei zehn Primern größtenteils eine gute Zuordnung zwischen den Standorten innerhalb einer Rasse erkennbar. Bei einem Einsatz von 20 Primern wurde die beste standortspezifische Zuordnung erzielt. Dem gegenüber wurde in einer RAPD-Arbeit über die Charakterisierung von chinesischen Populationen der Weißen Fliege *Bemisia tabaci* keine klare Zuordnung der einzelnen Individuen zu einer Population hergestellt (WU et al., 2002). Von den zehn untersuchten Populationen wurden pro Population ebenfalls fünf Individuen eingesetzt, die sich nicht nur im Standort, sondern auch von der besiedelten Kulturpflanze unterschieden. Einige Populationen charakterisierten den B-Biotyp, der sich deutlich von zwei anderen Biotypen (Guangxi und Fujian) abgrenzte. Innerhalb des Biotyps B hatten sich standortspezifische Merkmale noch nicht manifestiert. Dies könnte u. a. damit zusammenhängen, dass der Anbau der Kulturpflanzen in Gewächshäusern stattfand, und sich damit umweltrelevante Merkmale der Standorte nur in geringem Maße in den Genotypen widerspiegeln können. Kritisch zu betrachten ist auch hier die geringe Anzahl von vier Primern mit nur 39 Banden und die geringe Individuenzahl pro

Population. So geben CLARK & LANIGAN (1993) nach Computer-Simulationen für die RAPD-Analysen an, dass bei einer Individuenzahl kleiner 10 die größte Schwankungsbreite bei der Anzahl der Banden pro Individuum existiert. Auch bei Blattläusen der Art *Sitobion avenae*, mit denen STILMANT et al. (1997) arbeiteten, konnte bei einer Anzahl von zehn Primern mit 80 Banden keine vollständige Zuordnung von neun Einzeltieren zu einer Subpopulation aufgezeigt werden. Aber auch die zu jeweils einer Population gehörenden drei Subpopulationen, welche weniger als 1 km voneinander entfernt waren, zeigten keine gute Separierung. Diese Nichtzuordnung der Subpopulationen wurde damit erklärt, dass es sich bei diesen um Metapopulationen handelt, die bedingt durch die geringe geographische Distanz einen starken genetischen Austausch aufzeigten. Weiterhin könnte auch hier die geringe Primer- und damit Bandenanzahl dazu beigetragen haben, dass sich die Einzeltiere einer Population nicht zusammengruppierten ließen. Allerdings konnte zwischen Populationen, die eine Distanz größer 50 km besaßen, eine bessere Zuordnung der Einzeltiere vorgenommen werden. Sogar in einer AFLP-Arbeit von REINEKE (1998), die zur Bestimmung der genetischen Variation zwischen vier Schwammspinner-Populationen 414 Fragmente auswertete, ließ sich auch nicht bei allen Populationen eine standortspezifische Zuordnung anhand von Einzeltieren aufzeigen.

Es bleibt offen, ob auch in der vorliegenden Arbeit bei einer höheren Anzahl an Primern und damit Banden sowie einer höheren Anzahl an Individuen eine populationsgenetische Analyse mit Einzeltieren möglich gewesen wäre. Dies hätte jedoch einen wesentlich größeren Arbeitsaufwand (mehr Extraktionen, PCR-Ansätze, Gelelektrophoresen) erfordert. STILMANT et al. (1997) untersuchten Einzeltiere von *S. avenae*, waren aber dennoch gezwungen die Einzeltiere einer Population zu gruppieren und mittels des Steinhaus-Koeffizienten die Clusteranalysen durchzuführen. Es stellt sich damit generell die Frage, warum nicht bereits bei der Extraktion eine Poolung von Einzeltier-DNA vorgenommen wurde. Des Weiteren ist eine Auswertung über mehrere Gele ungenauer als innerhalb eines Gels, da Gelelektrophoresen nie hundertprozentig identisch laufen. Zusammenfassend ist festzustellen, dass in anderen entomologischen PCR-Arbeiten, bei einer ausreichenden Anzahl an Primern und damit polymorphen Banden, eine klare Zuordnung von genetisch nahestehenden Einzeltieren zu Biotypen, Rassen und geographisch weit entfernten Populationen erfolgte. Innerhalb einer Rasse oder eines Biotyps ist es schwieriger, bei einer geringen Anzahl an Primern (fünf bis fünfzehn) eine Standort- bzw. Populationspezifität anhand von wenigen Einzeltieren zu treffen.

4.2.2.2 Poolung von Einzeltieren

Der nächste Schritt für eine optimale Charakterisierung der Population war eine Poolung der DNA-Extrakte von Einzeltieren **nach einer Extraktion**, bei der schon ab einer Anzahl von fünf bis zehn Individuen annähernd gleiche RAPD-Muster für jede Gruppe erzielt wurden. In Abhängigkeit vom Primer konnte ab einer Mischung von 20 – 25 Einzeltier-DNA-Extrakten vollständige Uniformität der RAPD-Muster erreicht werden. Eine noch schnellere und einfachere Eliminierung von individuellen Banden und eine Gewinnung von populationspezifischen Banden gelang bei einer Poolung von Einzeltieren **vor der Extraktion**. DNA-Extrakte von jeweils 20 gepoolten Larven lieferten einheitliche RAPD-Muster. In den meisten entomologischen RAPD-Arbeiten wird für Populationsstudien mit Einzeltieren gearbeitet. In einigen Arbeiten wurde ebenfalls eine Poolung von Einzeltieren vorgenommen, so bei der Sitkatfichtenlaus *Elatobium abietinum* – 25 Individuen (SIGURDSSON et al., 1999), bei der Mücke *Anopheles gambiae* und *A. arabiensis* – 5 Individuen (WILKERSON et al., 1993), beim Fransenflügler *Aeolothrips intermedius* – 100 Individuen (BAYAR et al., 2001) und bei der Weißen Fliege *Bemisia tabaci* – 20 Individuen (CERVERA et al., 2000). Kritisch anzumerken ist, dass in der vorliegenden Arbeit bei den Einzeltier-DNA-Extrakten, bei denen gut abgrenzbare Banden erzeugt wurden, im Vergleich zu den Tiergruppen-DNA-Extrakten teilweise eine starke Hintergrundfärbung auftrat. Dies ist mit der Überlappung vieler individueller Banden der Einzeltier-DNA-Extrakte innerhalb eines Tiergruppen-DNA-Extraktes bei stark polymorphen Primern zu erklären. Dadurch wird die Auswertung der RAPD-Banden erschwert. Da jedoch in dieser Arbeit 20 Primer eingesetzt wurden, konnte eine ausreichende Bandenzahl für die Auswertung erhaltenen werden. Auch in den Untersuchungen von WILLIAMS et al. (1993) wird darauf hingewiesen, dass ein komplexes Genom mehr Bindungsplätze für einen Primer besitzt und damit eine große Anzahl an Banden produziert. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen qualitativen Unterschiede zwischen Einzel- und Tiergruppen-DNA-Extrakten scheinen jedoch nicht auf alle Insektenarten und molekularbiologischen Methoden zuzutreffen. Ein Beispiel dafür kann bei der Weißen Fliege *Bemisia tabaci* angeführt werden, bei der die AFLP-Muster von 20 gepoolten Einzeltier-DNA-Extrakten die gleiche Qualität wie die von nicht gepoolten Einzeltier-DNA-Extrakten (CERVERA et al., 2000) erreichte.

4.2.2.3 Variabilität durch Geschwister und bei Inzucht

Um den Einfluss von Geschwistern und einer zunehmenden Inzucht auf die RAPD-Muster von *O. nubilalis* zu untersuchen, wurden jeweils von drei Geschwistergruppen je fünf Individuen von einer F1-Generation, einer F3-Generation und einer langjährigen Laborpopulation getestet. Bei der Untersuchung von Geschwistern zeigte sich, dass diese im Vergleich zu Nichtgeschwistern ein ähnlicheres RAPD-Muster aufwiesen. Bei dem Vergleich der genetischen Ähnlichkeit von Geschwistern und Nichtgeschwistern wurde deutlich, dass die Geschwister (F1-Generation) die höchste Ähnlichkeit mit 57 % (Tab. 26) gegenüber Nichtgeschwistern mit 46 % (Tab. 24) besaßen. Auch REINICKE (1998) zeigte bei den Schwammspinnern *Lymantria dispar*, dass die zehn Vollgeschwister die höchste Ähnlichkeit gegenüber den Nichtgeschwistern der gleichen Population besaßen. Bei der parasitischen Wespe *Trioxys pallidus* wurden bei allen Nachkommen, sowohl der haploiden Männchen als auch der diploiden Weibchen, überwiegend homogene RAPD-Muster erzeugt (HOY, 1994). Der größte Variabilitätsfaktor war die unterschiedliche Bandenintensität. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Geschwister vom Feld (F1) zeigten erstaunlicherweise eine hohe Variation der individuellen RAPD-Muster und sind daher zur Populationscharakterisierung geeignet. Obwohl in der vorliegenden Arbeit eine hohe genetische Variabilität von jeweils drei Larven aus einem Stängel vom Feld nachgewiesen und somit keine eindeutige Geschwisterzugehörigkeit ermittelt wurde, ist eine Probensammlung von Larven aus verschiedenen Stängeln für eine bessere Repräsentativität der Population vorzuziehen.

Des Weiteren wurde anhand von nur zwei Primern gezeigt, dass die RAPD-Muster bei zunehmender zeitlicher Haltung der Tiere im Labor immer einheitlicher wurden. So erhöhte sich die genetische Ähnlichkeit von 57 % bei der F1-Generation über 62 % bei der F3-Generation auf 75 % bei einer über mehrere Jahre bestehende Laborzucht (Tab. 26). Somit verschwanden durch die zunehmende Inzucht nicht nur individuelle, sondern auch populationspezifische Banden. Inzucht wird als eine Paarung von Individuen bezeichnet, die eine engere Verwandtschaft besitzen als der Durchschnitt der Population (STÖCKER & DIETRICH, 1986). Mit steigender Inzucht wächst die Wahrscheinlichkeit, dass immer mehr Genorte eines Individuums homozygot werden und damit eine Abnahme der genotypischen Variabilität in der Population eintritt. Das Ausmaß der Inzucht und damit der Homozygotie wird umso größer je kleiner die Populationsgröße ist (CZIHAK et al., 1992). BLACK et al. (1992), die mit Blattlausparasiten *Diaeretiella rapae* arbeiteten, konnten keine Unterschiede im RAPD-Muster zwischen Individuen einer sehr alten

Laborzucht finden und vermuteten daher eine starke Inzucht. HAYMER (1995) zeigte bei der Melonenfliege *Bactrocera cucurbitae* ebenfalls anhand von nur zwei RAPD-Primern, dass ein Verlust an genetischer Variabilität zwischen verschiedenen Populationen nach sechs Generationen im Labor erfolgte. Beim Schwammspinner hingegen konnte nach einer Generation noch keine genetische Homogenisierung von Individuen unterschiedlicher Herkunft beobachtet werden (REINICKE, 1998). Etwas anders verhält es sich bei Laborzuchten, die regelmäßig (mindestens 1x Jahr) mit Tieren aus freilebenden Populationen aufgefüllt werden. Eine solche Mischpopulation aus Labor- und Feldlarven ging bei den Standorten Bodensee, Karlsruhe und Freiburg in die RAPD-Untersuchungen ein. Durch die ständige Zuführung von neuem heterogenem Material ist der Entstehung einer Inzucht entgegengewirkt worden. Dennoch sind die Larven einseitigen und konstanten abiotischen Bedingungen im Labor ausgesetzt. Daher ist es empfehlenswert, für populationsgenetische Untersuchungen stets Individuen aus natürlichen Populationen einzusetzen, da die auf sie einwirkenden Umwelteinflüsse einen höheren Grad an genetischer Variabilität erwarten lässt.

4.2.2.4 Feldgröße, Auswahl des Feldbereiches und Entwicklungsstadium der Probanden bei der Probensammlung

Bei den Untersuchungen zur **Feldgröße und der Auswahl des Feldbereiches** für eine repräsentative Stichprobe der Population zeigte sich, dass die RAPD-Muster innerhalb einer Teilfläche von ca. 200 m² – 300 m² eine höhere genetische Ähnlichkeit aufwiesen als zwischen verschiedenen Teilflächen gleicher Größe. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass in einem Feld mehrere Mikrohabitate existieren und Larven in einem eng begrenzten Bereich einem ähnlichen Mikroklima ausgesetzt sind. So kommt auch DEN BOER (1998) in seinen Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass sich in einer scheinbar homogenen Umwelt wichtige Umweltfaktoren, wie z. B. die Temperatur, über kurze Distanzen ändern und sich damit die Individuen aus verschiedenen Mikrohabitaten unterscheiden. Das bedeutet, dass von den vielen schlüpfenden Larven nur wenige überleben, die am besten an das Mikroklima angepasst sind. Eine weitere Möglichkeit, die zu ähnlichen Genotypen innerhalb eines Mikrohabitates führen, könnte durch eine besonders hohe Verwandtschaft (**Geschwister**) hervorgerufen worden sein. Da jedoch die F-Werte (Tab. 27) bei den Individuen aus einem Stängel kleiner waren als bei den Geschwistern vom Feld (F1), kann eine geschwisterliche Zugehörigkeit bei den Individuen aus einem Stängel nahezu ausgeschlossen werden. Gleichwohl muss davon ausgegangen

werden, dass Larven sich weniger horizontal als vertikal bewegen und somit in einem kleineren Gebiet ein höherer Verwandtschaftsgrad zu erwarten ist.

Weiterhin ergab sich zwischen der gepoolten Probe des gesamten Feldes und dem mittig gelegenen Feldbereich die höchste genetische Ähnlichkeit. Dies kann eine Folge von unterschiedlichen Einflüssen der Randbereiche auf die sich später etablierenden inneren Feldbereiche sein. So beschrieb LORENZ (1993), dass aufgrund des Befalls am Feldrand spätschlüpfende Weibchen zunehmend die inneren Feldbereiche für ihre Eiablage aufsuchen, da befallene Pflanzen repellente Wirkstoffe und Larven Exkremente abgeben, die unattraktiv für eierablegende Weibchen sind. Durch die Vermischung dieser unterschiedlichen Randeinflüsse, die durch den Zuflug verschiedener Teilpopulationen und durch eine zunehmende Eiablage von den äußeren zu den inneren Feldbereichen erfolgt, wird das Gesamtfeld am besten durch das Zentrum des Feldes charakterisiert. Weiterhin kann die genetische Ähnlichkeit auch durch klimatische Selektionsbedingungen an Eiern oder jungen Larven hervorgerufen werden. Zu den Unterschieden im Mikroklima zählen u. a. Luftfeuchtigkeit und extreme Temperaturschwankungen. So beschrieb LORENZ (1993), dass tiefere Maisbestände eine höhere Attraktivität gegenüber den Weibchen auslösen, da die Luftfeuchtigkeit von den Randbereichen des Feldes zur Feldmitte zunimmt. Auch nach BURGSTALLER (1974) führen Anbauflächen mit einer starken Verunkrautung zu einem verminderten Befall der Maispflanzen, da eine höhere Luftfeuchtigkeit in der Krautschicht besteht, die als alternativer Ort zur Eiablage von Bedeutung sein könnte. Als weitere Beeinflussung der Population werden von LORENZ (1993) neben den makro- und mikroklimatischen Gegebenheiten Krankheiten (Mikrosporidien) und natürliche Feinde, wie Nematoden, Arthropoden, Vögel und Säugetiere, angegeben. Es ist zu empfehlen, die Stichprobensammlung nicht ausschließlich in einem Randbereich durchzuführen, sondern eine Mischung aus verschiedenen Feldbereichen vorzunehmen oder bei einem starken Befall sich auf den mittleren Feldbereich zu konzentrieren. Je größer das Maisfeld und dessen Befall mit *O. nubilalis* ist, desto kleiner kann die beprobte Fläche für populationsgenetische Untersuchungen ausgewählt werden. Auch bei der parasitischen Wespe *Diaeretiella rapae* wurden aus verschiedenen Feldbereichen und von jeder Pflanze im Abstand von 10–20 Schritten jeweils nur ein Tier gesammelt, um eine repräsentative Stichprobe des gesamten Feldes zu erhalten und damit Nachkommen eines Weibchens (Geschwister) in der Probe auszuschließen (VAUGHN & ANTOLIN, 1998).

Eine weitere Möglichkeit der Probensammlung anstelle des Sammelns von Larven besteht in der Entnahme von **Eiern** auf Maispflanzen oder durch **Falterfänge** mittels Lichtfallen. Das Absammeln der Eier im Feld setzt eine Gleichverteilung der Eier voraus, um eine große Heterogenität der Genotypen zu erhalten. Das Aufstellen von mehreren weitverteilten Lichtfallen auf den Feldern ist, bezüglich der Stichprobensammlung, vergleichbar mit dem Sammeln der L5-Larven in verschiedenen Feldbereichen. Wenn jedoch Mais nach Mais angebaut wird, ist die Wahrscheinlichkeit bei den ersten Falterfängen sehr groß, dass es sich um Individuen im unmittelbaren Umfeld der Lichtfallen handelt und damit eine genetische Variation der Population vermindert wird. Auch die Wahl des richtigen Zeitpunktes für den Falterfang ist zu beachten. Nach LORENZ (1993) besteht nur ein kurzer Zeitraum für das gleichzeitige Auftreten beider Pheromonrassen bei einer zeitlichen Differenz im Schlupfbeginn von ca. zwei bis drei Wochen. Daher ist nur zum Flughöhepunkt der Z-Rasse ein Einflug von spät schlüpfenden Faltern der E-Rasse in die Lichtfallen nahezu auszuschließen. Weiterhin sind Lichtfallen von einer batteriebetriebenen Stromversorgung abhängig, die nahezu täglich erneuert werden muss und demzufolge hohe Kosten verursacht. Diese Erneuerung kann allerdings auch durch zuständige Personen der Schaderregerüberwachung vorgenommen werden. Ein Fangen der Falter mittels Lichtfallen ist bei einem geringen bis mittleren *O. nubilalis*-Befall zu empfehlen, weil dadurch eine schnellere Probenentnahme durchgeführt werden kann. Bei einem starken *O. nubilalis*-Befall ist das Sammeln der L5-Larven im Herbst vorzuziehen, da es weniger Kosten verursacht und bei gleichmäßiger Probenentnahme über das gesamte Feld eine größere genetische Variation der Population erfasst wird.

4.2.2.5 Einfluss der DNA der E-Rasse auf die Template-DNA der Z-Rasse

Bei der Stichprobensammlung ist eine Erfassung von Larven der E-Rasse nicht auszuschließen. Um diesen Einfluss von Larven der E-Rasse auf die RAPD-Muster von Larven der Z-Rasse nachzugehen, wurde eine Mischung der 20er-Tiergruppen-Extrakte von der E- und Z-Rasse untersucht. Dabei zeigte sich eine starke Differenzierung der Mischpopulation aus E- und Z-Rasse zu den Populationen der Z-Rasse. Somit wiesen die RAPD-Muster schon bei einer 50 %igen genetischen Veränderung in der Template-DNA eine klare rassenbezogene Differenzierung auf. Eine Differenzierung zwischen Arten zeigte ZAKHAROV (2001), der anhand der RAPD-PCR bei Hybriden der Schmetterlingsarten *Parnassius nomion* und *Parnassius bremeri* eine eindeutige Separation gegenüber den Ausgangsarten aufzeigen konnte. Aus den in dieser Arbeit

erzielten Ergebnissen ist bei weiteren Stichprobensammlungen zu beachten, dass nur Feldbereiche, die mehr als 100 m vom Feldrand entfernt sind, beprobt werden. Dies ist wichtig, da nach dem Schlupf der Larven eine horizontale Verbreitung der Larven von stark befallenen zu unbefallenen Pflanzen (BURGSTALLER, 1974) erfolgt. Dabei können Larven der E-Rasse 50 m – 100 m ins Maisfeld einwandern (LANGENBRUCH et al., 1985). Dies bestätigten Arbeiten von WELLING (1984) und HOSANG (1985), die im Ruhrgebiet in den Jahren 1983 - 1985 eine Besiedlung des Mais von Populationen der E-Rassen aus norddeutschem Beifuß beobachteten. Bei dann ausschließlich randständiger Probenentnahme kann dies eine Auswirkung auf die Charakterisierung der Z-Population zur Folge haben.

4.2.3 Überprüfung der RAPD-Ergebnisse durch Nutzung weiterer DNA-analytischer Techniken

Der Schwerpunkt der Arbeit bestand in der Ermittlung von genetischen Ähnlichkeiten der deutschen *O. nubilalis*-Populationen mittels RAPD-PCR und die sich daraus ergebenden Schlussfolgerungen für das Insektenresistenzmanagement. Um diese RAPD-Ergebnisse zu stützen, wurden genetische Analysen der rDNA sowohl von *O. nubilalis* als auch von dessen Darmbakterien durchgeführt. Bei der Analyse der eukaryontischen rDNA von *O. nubilalis* wurde schrittweise vorgegangen: Amplifikation des ITS-1-Fragments, RFLP, TGGE und Sequenzierung. Die prokaryontische rDNA wurde mit Hilfe der T-RFLP analysiert. Die Analysen der eukaryontischen rDNA zeigten, dass es nicht möglich war, eindeutige und abgesicherte Unterschiede zwischen den *O. nubilalis*-Populationen anhand des ITS-1-Fragments mit Hilfe der ITS-RFLP, TGGE und Sequenzierung festzustellen. Auch anhand des Bakterienspektrums mittels T-RFLP konnte kein Zusammenhang zu den Gruppierungen der lokalen *O. nubilalis*-Populationen hergestellt werden. Eine Unterscheidung zeigte sich jedoch bei der Sequenzierung zwischen den beiden ökologischen Rassen (Ökotypen) von *O. nubilalis*.

4.2.3.1 ITS-1-Fragmente von *O. nubilalis*

Das ITS-1-Fragment hat eine oder mehrere Schnittstellen für 40 % der in den Vorversuchen getesteten Restriktionsenzyme. In der Arbeit von MARCON et al. (1999), die mit Einzeltier- statt mit Tiergruppen-DNA-Extrakten von *O. nubilalis* arbeiteten und die genetische Variation zwischen Populationen, Rassen und Arten anhand des ITS-1-

Fragments untersuchten, konnten von den getesteten Restriktionsenzymen 60 % eingesetzt werden. Die Fragmente, die in der vorliegenden Arbeit mit den Enzymen RsaI und HaeIII erhalten wurden, variierten in der Anzahl und Länge im Vergleich zu den Fragmenten von MARCON et al. (1999). Bei dem Enzym HaeIII wurden nur geringe Unterschiede in den Fragmentlängen von 4 bp – 13 bp bestimmt (Tab. 39). Das Enzym RsaI zeigte bei der RFLP nur drei sichtbare Fragmente. Erst nach der Sequenzierung konnten vier Restriktionsschnittstellen und damit fünf Fragmente ermittelt werden. Im Vergleich zu MARCON et al. (1999) bestehen bei den drei großen Fragmenten Längenunterschiede zwischen 2 bp und 25 bp (Tab. 39). Diese Unterschiede lassen sich teilweise durch die verschiedenen Auswertungsarten der beiden Arbeiten erklären, indem MARCON et al. (1999) seine Restriktionsfragmente (RF) mit einer Genauigkeit von 2 bp auf dem MetaPhor®-Gel bestimmte, hingegen in dieser Arbeit die genaue Länge des RFs erst nach der Sequenzierung ermittelt wurde.

Tab. 39: Anzahl und Länge der ITS-1-Restriktionsfragmente von MARCON et al. (1999) und den in der vorliegenden Arbeit

Enzym	MARCON et al. (1999)	LIEBE (2004)
RsaI	173 bp, 138 bp, 122 bp, 35 bp, 16 bp = 484 bp	198 bp, 131 bp, 124 bp, 35 bp, 16 bp = 504 bp
HaeIII	422 bp, 99 bp = 521 bp	409 bp, 95 bp = 504 bp

Zwischen den Gattungen *Ostrinia*, *Ephestia* und *Plodia* konnten Unterschiede in der Größe der **ITS-1-Fragmente** aufgezeigt werden. Ebenso wurden zwischen den Gattungen des Mais (BUCKLER & HOLTSFORD, 1996) und von *O. nubilalis* (MARCON et al., 1999), zwischen den Arten bei *Acropora* spp. (Cnidaria) (ODORICO & MILLER, 1997) und bei *O. nubilalis* (MARCON et al., 1999), zwischen den Arten und ihren Untergruppen bei *Diabrotica* spp. (Coleoptera) (CLARK et al., 2001) und zwischen den Linien bei Hymenoptera (SILVA et al., 1994) eine unterschiedliche Größe der ITS-Fragmente (Sequenzheterogenitäten) aufgedeckt. In der vorliegenden Arbeit war es jedoch nicht möglich, Unterschiede in ITS-1-Fragmenten mittels PCR-RFLP zwischen den *O. nubilalis*-Populationen und Rassen zu erhalten. Ähnliche nicht vorhandene Differenzierungen im ITS-1-Fragment mittels PCR-RFLP wurden auch zwischen den Populationen des südlichen Wurzelmaisbohrers *Diabrotica* spp. gefunden (SZALANSKI & OWENS, 2003). Dagegen konnten ROEHRDANZ et al. (2003) Sequenzunterschiede im ITS-1-Fragment bei

Populationen des nördlichen Wurzelmaisbohrers *Diabrotica barberi* feststellen. ABDULLAHI et al. (2003) konnten bei der Weißen Fliege *Bemisia tabaci* zeigen, dass die zwei Cassava-Populationen (befallen Maniok-Pflanzen) und die Nicht-Cassava-Populationen (befallen andere Pflanzen) Unterschiede in der ITS-1-Sequenz besitzen. Somit wirkte sich bei der Weißen Fliege *B. tabaci* im Unterschied zu den *O. nubilalis*-Rassen die Spezifität der Wirtspflanzen im ITS-1-Fragment aus.

4.2.3.2 TGGE der ITS-1-Fragmente

Bei der anschließenden TGGE, die überwiegend für Untersuchungen von Mikroorganismen-Gesellschaften (GOMES et al., 2001; ENGELEN et al., 1995; MUYZER & SMALLA, 1998) oder von Populationen ohne weitere Charakterisierung ihrer einzelnen Mitglieder (MUYZER, 1999) herangezogen wird, wurde das ITS-1-Fragment eingesetzt. Nach den Empfehlungen von ETSCHIED & RIESNER (1998) für populationsgenetische Untersuchungen mittels TGGE wurden zunächst Tiergruppen-DNA-Extrakte eingesetzt, die bei diesen DNA-Mischungen seltene Mutationen von 1:100 aufdecken können. Erst wenn diese Mischprobe interessante Sequenzunterschiede aufzeigt, sollten Einzeltiere jeder Population untersucht werden. Durch die verschiedenen TGGE-Analysen (mit und ohne GC-Klammer; GC-Klammer beim forward und reverse Primer), die eine unterschiedliche Bandenzahl lieferten, konnte eine unterschiedliche Anzahl an Sequenzheterogenitäten zwischen den untersuchten Lokalpopulationen erkannt werden. Allerdings zeigte nur der forward-Primer mit GC-Klammer eine unterschiedliche Anzahl an ITS-1-Typen zwischen den Lokalpopulationen der Z-Rasse und zwischen beiden Rassen. So wurde bei der E-Rasse eine Variante des ITS-1-Typ weniger, hingegen bei den südwestdeutschen Lokalpopulationen (Bodensee und Karlsruhe) eine zusätzliche Variante gegenüber allen anderen Populationen, erhalten. Diese TGGE-Ergebnisse stützen die RAPD-Ergebnisse, bei denen sich die E-Rasse schon in einer Mischung mit der Z-Rasse deutlich von Populationen der Z-Rasse abgliederte. Ebenso distanzierten sich die südwestdeutschen Lokalpopulationen in der RAPD-PCR von allen untersuchten Lokalpopulationen. Da jedoch eine starke undeutliche Hintergrundfärbung bestand, könnte die unterschiedliche Mobilität der Schmelzdomänen auch durch die Reinheit und die Art des PCR-Produktes beeinflusst worden sein (BACKHAUS, 1995). Da nach HOY (1994) die meisten Insekten zwischen 200 (z. B. *Drosophila melanogaster* (INDIK & TARFTOF, 1980)) und 500 rRNA-Gene besitzen, kann vermutet werden, dass bei einem optimalen Schmelzverhalten der verschiedenen Schmelzdomänen noch weitere Varianten des ITS-1-

Typs und/oder unterschiedliche Nukleotidabfolgen innerhalb der gleichen Varianten bei *O. nubilalis* bestehen. Bei der Kleiderlaus *Pediculus humanus* konnte nicht nur zwischen Individuen (50 ITS-2-Typen), sondern auch innerhalb eines Individuums (2 - 17 ITS-2-Typen) eine unterschiedliche Anzahl von Variationen des ITS-2-Typs ermittelt werden (LEO & BAKER, 2002). Zur Validierung der TGGE-Ergebnisse wurde eine Sequenzierung mit allen ITS-1-Typen der Tiergruppen-DNA-Extrakte von deutschen, französischen und polnischen Populationen durchgeführt.

4.2.3.3 Sequenzierung der ITS-1-Fragmente von Populationen der Z-Rasse

Die Sequenzierung des 505 bp-Fragments ergab, dass hier keine Sequenzunterschiede zwischen den verschiedenen Z-Populationen bestehen. Die Daten wurden anschließend mit der von MARCON et al. (1999) publizierte Sequenz in der Datenbank NCBI Sequence Viewer Accession-Number AF077013 verglichen. Dabei zeigten sich an drei verschiedenen Stellen im konservierten 18S rDNABereich Unterschiede gegenüber den Sequenzdaten nach MARCON et al. (1999), die *O. nubilalis*-Populationen aus Italien und Amerika untersuchten (Abb. 55).

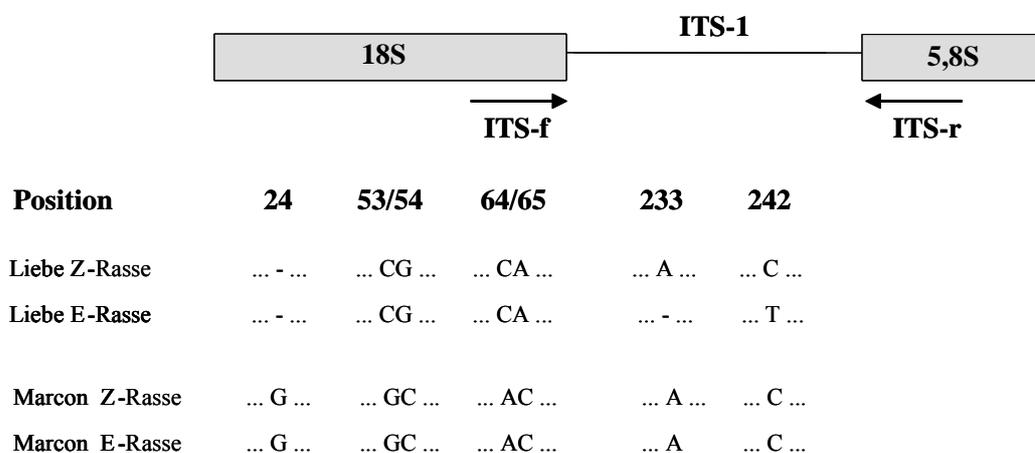


Abb. 55: Schematischer Vergleich der Nukleotidabfolge von der 18S rDNA und der ITS-1-Sequenz zwischen MARCON et al. (1999) u. den Ergebnissen aus dieser Arbeit (LIEBE)

In der vorliegenden Arbeit wurde bei Position 24 eine Deletion des G-Nukleotids gegenüber MARCON et al. (1999) festgestellt. Bei den anderen beiden Sequenzunterschieden handelte es sich um Inversionen in den Positionsbereichen 53 bp - 54 bp (CG↔GC) und 64 bp – 65 bp (CA↔AC). Da jedoch die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Sequenzabfolge von *O. nubilalis* mit den sieben Arten *Attacus ricini*, *Galleria*

mellonella, *Bombyx mori*, *Hyles lineata*, *Anthocharis sara*, *Prionoxystus robiniae* und *Platyptilia* sp. übereinstimmte, die mit Hilfe des Suchalgorithmus von ALTSCHUL et al. (1997) für die Sequenzdatenbank BLAST ermittelt wurde, ist nicht davon auszugehen, dass zwischen verschiedenen Arten weniger Sequenzunterschiede bestehen als innerhalb einer Art. Daher ist es möglich, dass die Unterschiede zu den hier vorgelegten Sequenzen auf einen technischen Fehler von MARCON et al. (1999) zurückzuführen sind.

4.2.3.4 Vergleich der ITS-1-Sequenz von Einzeltieren und Tiergruppen

Obwohl in der Arbeit von MARCON et al. (1999) Einzeltier-DNA-Extrakte statt Tiergruppen-DNA-Extrakte sequenziert wurden, waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Alignments ermittelt worden. Nur an der Position 296 bp wurde in der vorliegenden Arbeit ein Unterschied zwischen den Sequenzen der Einzeltier-DNA-Extrakte (A-Nukleotid) zu den Tiergruppen-DNA-Extrakte (M-Nukleotid) festgestellt. Somit kann dies ein Hinweis darauf sein, dass bei *O. nubilalis* einzelne Nukleotidpositionen variabel sind, wenn ein technischer Fehler bei der Sequenzierung auszuschließen ist. Dieser Sequenzunterschied scheint nur bei einer geringen Anzahl an Individuen zu bestehen, da das Restriktionsenzym *RsaI* einheitlich bei allen Tiergruppen-DNA-Extrakten drei Fragmente hervorbrachte, obwohl sich die Sequenzheterogenität in der Schnittstelle befand. Intraspezifische Variation der ITS-1 Region wurde auch in anderen Tierstämmen bspw. bei Nematelminthen (CHERRY et al., 1997) und Phthiraptera (LEO & BARKER, 2002) nachgewiesen und sogar innerhalb eines Individuums, wie Klon-Untersuchungen von LEO & BARKER (2002) zeigten.

4.2.3.5 Vergleich der ITS-1-Sequenz von E- und Z-Rasse

Zwischen der E- und Z-Rasse wurden gegenüber den Untersuchungen von MARCON et al. (1999) zwei Sequenzunterschiede im ITS-1-Fragment detektiert (Abb. 55). Da in der vorliegenden Arbeit keine Klonierung vorgenommen wurde, ist die Sequenz der relativ häufigsten Variante des ITS-1-Typs dargestellt worden. Das bedeutet, dass z. B. bei der Z-Rasse die meisten ITS-1-Typen an Position 242 bp ein C-Nukleotid besitzen, wohingegen die E-Rasse überwiegend ein T-Nukleotid besitzt. Da sich diese Punktmutationen nicht im Bereich der Restriktionsschnittstellen befinden, konnten sie bei der ITS-RFLP nicht sichtbar werden. Je nach relativer Häufigkeit von möglicherweise vorliegenden anderen

Varianten können jedoch Heterogenitäten durch uneindeutige Sequenzpositionen schwer oder gar nicht erkannt werden.

Nach statistischen Schätzungen von MARCON et al. (1999), die einen fixierten Nukleotidunterschied nach ca. 30 000 Jahren in einem 500 bp ITS-1-Fragment annehmen, könnten sich die E- und Z-Rasse vor über 60 000 Jahren voneinander getrennt haben. Diese zeitliche Trennung ist jedoch nur anzunehmen, wenn MARCON et al. (1999) davon ausgegangen sind, dass sich die Pheromonänderung gleichzeitig mit einer Nukleotidveränderung im 500 bp-ITS-1-Fragment ereignete. Andernfalls hätten sich die Rassen statistisch gesehen vor über 90 000 Jahren getrennt (unter der Bedingung, dass die Pheromonänderung in dem gleichen Zeitfenster entstanden ist wie die Veränderung im ITS-1-Fragment), da der Unterschied der Pheromonverhältnisse zwischen der Z-Rasse mit 97:3 und der E-Rasse mit 1:99 (LINN et al., 2003) vermutlich vor der Mutation im 500 bp-ITS-1-Fragment entstanden ist. Als dritte Variante könnte sich zuerst das ITS-1-Fragment verändert haben, wenn sich eine Population so stark separierte, dass einerseits eine Vermischung der Genotypen nicht mehr möglich war, aber andererseits sich noch keine Rassentrennung vollzog. Aus diesen Ergebnissen kann geschlussfolgert werden, dass sich die E- und Z-Rasse weit vor der Einführung des Mais nach Europa im 15. Jh. getrennt haben. Es muss somit eine andere evolutionäre Kraft als die des Maisanbaues für die Aufspaltung der Rassen bestanden haben. Nach LORENZ (1993) liegt der Selektionsdruck für die E-Rasse auf einem frühen Schlupf, um die Fraßzeit für ein großes Larvengewicht zu maximieren und damit einer geringeren Winter-Mortalität entgegen zu wirken. Die geschätzte statistische Zeitangabe von MARCON et al. (1999) kann jedoch nur bei einer Mischung aller ITS-1-Typen angewendet werden, da bei Klonierungen der ITS-Fragmente bedeutend mehr Unterschiede erwartet werden. Andererseits ist es jedoch fraglich, ob Sequenzunterschiede einzelner Varianten für die zeitliche Ermittlung der Rassen-Entstehung einzusetzen sind. So konnten bei der Kopflaus *Pediculus humanus*, durch eine große Anzahl an Sequenzunterschieden zwischen verschiedenen Tieren und sogar innerhalb eines Tieres anhand von klonierten ITS-2-Fragmenten, keine phylogenetischen Informationen zu den Populationen ermittelt werden (LEO & BARKER, 2002). Die *O. nubilalis*-Populationen hingegen, die noch keine vollständige Trennung im kurzen evolutionären Zeitfenster vollzogen haben, können ohne Klonierung nur dominierende Sequenztypen aufzeigen.

4.2.3.6 Unterscheidung der E- und Z-Rasse anhand von möglichen Primern und Enzymen

Aufgrund der zwei Nukleotid-Unterschiede zwischen der E- und Z-Rasse wurde versucht rassenspezifische Primer zu entwickeln, denn nur die Z-Rasse, die vorrangig im konventionellen Mais vorkommt, kann für das IRM berücksichtigt werden. Dadurch wäre eine aufwendige Pheromonbestimmung bei Faltern nicht mehr notwendig und auch Larven könnten somit der Rasse zugeordnet werden. Diese Zuordnung ist notwendig, um eine Verunreinigung der Probenentnahme mit Tieren aus der E-Rasse auszuschließen. Weiterhin könnte bei einem Befall anderer Kultursorten durch den Maiszünsler die Rasse schnell identifiziert werden. Leider konnte das entwickelte Primerpaar ecb.ez.2f/2r die geringen genetischen Divergenzen nicht für eine spezifische PCR nutzbar machen. Neben der Taq-Polymerase konnte auch durch den Einsatz der Polymerase Stoffelfragment, welches möglicherweise eine höhere Sensibilisierung von Fehlpaarungen zwischen Primer und Template besitzt, keine selektive Amplifikation erzielt werden.

Eine andere Möglichkeit der rassenspezifischen Unterscheidung ist der Einsatz von Restriktionsenzymen, die durch die Nukleotidunterschiede an den Positionen 233 und 242 eine unterschiedliche Spaltung ergeben müssten. Daher wurde ein Restriktionsstellenscreening mit dem nicht frei verfügbaren Programm Genetics Computer Group (GCG) mit Unterstützung des Max-Planck-Instituts für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm durchgeführt, das eine passende Restriktionsabfolge ermittelte (pers. Mitt. Prof. HEYER, 2003). Das entsprechende Restriktionsenzym mit der Bezeichnung Tth111II (Klasse II S) wurde aus dem Bakterium *Thermus thermophilus* Stamm 11 gewonnen und besitzt die Erkennungssequenz CAARCA(N)_{11/9}. Dieses Enzym schneidet auf dem forward-Strang der Erkennungssequenz nach 11 Nukleotiden und auf dem reverse-Strang nach 9 Nukleotiden. Durch die Verwendung der Primer ecb.ez.2f (Position 109) und ecb.ez.3r (Position 373) wird eine 264 bp lange Bande amplifiziert. Das Enzym Tth111II könnte nur die Bande der E-Rasse schneiden und damit eine Rassenunterscheidung ermöglichen, die für die Untersuchung der Ausbreitung und für die Probensicherheit von Bedeutung sein kann. So könnte bspw. bei einem ökonomisch bedeutenden Befall einer bisher noch nicht von *O. nubilalis* geschädigten Kulturpflanze, die darauf adaptierte Rasse ermittelt werden. Bei der RFLP würden zwei ähnlich lange Fragmente mit einer Länge von 130 bp und 134 bp entstehen. Da im ITS-1-Fragment der Z-Rasse gegenüber der E-Rasse ein zusätzliches A-Nukleotid existiert, ist keine Restriktionsspaltung möglich. Leider ist das Enzym Tth111II zurzeit nicht kommerziell

erhältlich (ROCHE, 2000), so dass keine RFLP durchgeführt werden konnte. Auch für die zweite Position 242 bp wurde ein Restriktionsenzym gefunden, das jedoch bisher weder einen Namen besitzt noch kommerziell verfügbar ist. Es ist durch die Erkennungsregion ACW*GA charakterisiert (Roche, 2000) und würde nur die Bande der Z-Rasse spalten, da nur dieses am zweiten Erkennungsnukleotid ein C-Nukleotid enthält. Die beiden erwähnten Restriktionsenzyme könnten durch die unterschiedlichen Spaltungen zwischen den Rassen eine Differenzierung ermöglichen, wenn diese hergestellt werden bzw. kommerziell erhältlich sind.

Auch die bei der TGGE enthaltene Variante zwischen der E- und Z-Rasse (Abb. 49 ITS-Typ 2*) könnte für die Entwicklung von rassenspezifischen Nachweisverfahren herangezogen werden. Dazu müsste diese Variante nach weiteren Optimierungen zur Trennung der Variantenvielfalt isoliert und anschließend sequenziert werden.

4.2.3.7 Spezifische Primer zum Nachweis von *O. nubilalis*

Das in dieser Arbeit entwickelte Primerpaar ecb.ez.3f/3r amplifiziert eine kurze Bande von 166 bp bei der Z-Rasse und 165 bp bei der E-Rasse. Es kann zum Nachweis der Art *Ostrinia nubilalis* im Darmtrakt von Prädatoren dienen. So konnten bereits HOOGENDOORN & HEIMPEL (2001) Untersuchungen zur Nahrungspräferenz an Käfern der Art *Coleomegilla maculata* vornehmen. Anhand ihrer eigenen entwickelten Primersets konnten sie zeigen, dass das kürzeste ITS-1-Fragment von *O. nubilalis* mit einer Größe von 150 bp noch 12 Stunden nach der Aufnahme der *O. nubilalis*-Larven durch die Käfer nachgewiesen werden konnte.

4.2.3.8 T-RFLP der bakteriellen rDNA von *O. nubilalis*

Ergänzend zur Untersuchung der *O. nubilalis*-DNA wurde eine Analyse der bakteriellen DNA mit Hilfe der T-RFLP durchgeführt. Es sollte geprüft werden, ob die Diversität der Bakteriengesellschaften im Darm von *O. nubilalis* zu einer Gruppierung der Populationen führt, die möglicherweise die Ergebnisse aus der RAPD-PCR zur Gruppierung der Populationen stützt. Dafür wurde bakterielle 16S rDNA ausgewählt, die meist als molekulares Chronometer, d. h. als Molekül bezeichnet wird, dessen Sequenz sich mit der Zeit zufällig verändert. Im Gegensatz zu dem untersuchten Spacerbereich (ITS-1) zwischen den ribosomalen 18S und 5,8S Abschnitten von *O. nubilalis* wurde hierbei der ribosomale 16S-Bereich der Prokaryonten amplifiziert. Eine vereinfachte Übersicht der

rDNA zwischen Pro- und Eukaryonten ist in der Tabelle 40 zusammengestellt (ANONYMUS, 1994).

Tab. 40: Übersicht der rDNA bei Pro- und Eukaryonten (untersuchte rDNA-Bereiche wurden fett dargestellt)

Eukaryonten (Cytosomen)	Prokaryonten
(24-)28S	(21-)23S
(16-)18S	16S (ca. 1 500 bp)
5,8S (180 bp)	
5S (120 bp)	5S

Das prokaryontische 16S rDNA-Molekül wird für folgende Untersuchungen häufig eingesetzt:

- als phylogenetischer Genmarker, um evolutionäre Beziehungen der Mikroorganismen aufzuzeigen (WOESE, 1987; LUDWIG et al., 1998 zitiert in: HORZ, 2000);
- zur Charakterisierung von Bakteriengesellschaften innerhalb eines Umweltmediums, z. B. bei der Wurzel des Mais (CHELIUS & TRIPLETT, 2001; GOMES et al., 2001);
- zur Charakterisierung von spezifischen Bakteriengesellschaften in verschiedenen Umweltmedien (LIU et al., 1997).

Es ist davon auszugehen, dass der *O. nubilalis*-Darm von Mikroben besiedelt wird, da der Darm vieler Insekten eine große Diversität der Mikroflora besitzt (BIGNELL, 1984). Dabei kann es sich um ubiquitäre oder um spezielle Bakterien handeln, die über den Fraß im Stängel und von den Maisblättern aufgenommen werden. Diese Bakterien stammen von der Rhizosphäre und zeigen in dieser bei älteren Maispflanzen eine höhere Diversität als bei jüngeren Pflanzen (GOMES et al., 2001). Sie durchdringen das Wurzelgewebe, gelangen ins Xylem und werden anschließend durch das Gefäßsystem der Pflanze transportiert, um dieses systemisch zu kolonisieren (GERMAINE et al., 2004). Einmal im Stängel angekommen sind sie in der Lage, hohe Zellzahlen pro Gramm Frischgewicht zu erreichen. Aufgrund des im Maisstängel lebenden *O. nubilalis* nehmen die Larven mit der Nahrung die bakterielle Diversität auf.

Durch die Amplifizierung von mehreren Fragmenten der bakteriellen rDNA mit Hilfe der Primer 799f und 1492r konnte ein Bakterienspektrum nachgewiesen werden. Für die Untersuchungen wurden die Enzyme TaqI und HhaI eingesetzt. Auf den Einsatz weiterer Enzyme wurde verzichtet, da bereits LIU (1997) zeigte, dass durch den gleichzeitigen

Einsatz der Enzyme HhaI und MSPI kaum weitere Fragmente hinzukamen. Die Untersuchungen beinhalteten erstens die Bestimmung der Bakterienspektren von verschiedenen Körperabschnitten und zweitens einen Vergleich der Bakterienspektren in Abhängigkeit von der Herkunft der Population. Zur Bestimmung der **Bakterienspektren von verschiedenen Körperabschnitten** von *O. nubilalis* wurde sowohl der Darm als auch darmfreies Gewebe erfasst. In allen Körperabschnitten wurde ohne Restriktionsspaltung ein ca. 735 bp-Fragment amplifiziert. LANE (1991) und CHELIUS & TRIPLET (2000) konnten bei ihren Untersuchungen zur Bakterien-Gesellschaft der Wurzeln des Mais noch ein zusätzliches größeres Fragment amplifizieren. Dabei handelte es sich um die mt(DNA) des Mais. Damit wurde in den vorliegenden Untersuchungen wiederholt bestätigt, dass keine intakte Mais-DNA im Darm von *O. nubilalis* vorlag. Weiterhin zeigte ein Screening der 14 535 bp langen mitochondrialen *O. nubilalis*-DNA in der Datenbank NCBI Sequence Viewer Accession-Number NC_003367, dass der forward-Primer 799f keine Bindungsstellen besaß und beim reversen Primer 1492r nur 12 bp von 22 bp im mt-DNA-Bereich von 1434 bp – 1446 bp übereinstimmten. Dadurch konnte ebenfalls keine mt(DNA) von *O. nubilalis* amplifiziert werden. Die Untersuchungen zeigten weiterhin, dass die DNA aus dem Kopf-Bereich nur ein starkes terminales Restriktions-Fragment (T-RF) von ca. 40 bp besaß. DNA aus den anderen Körperabschnitten hingegen, besonders dem Darmbereich, wiesen mehrere kräftige Fragmente im Bereich von 38 bp bis 50 bp auf. Da CHELIUS & TRIPLET (2000) beim Fragment 735 bp keine Sequenzen von Mitochondrien, Chloroplasten und Eukaryonten nachwiesen, nahmen sie eine hohe Spezifität des Primers 799f für bakterielle Sequenzen an. Daher kann es sich bei allen amplifizierten Fragmenten der Körperabschnitte nur um ubiquitäre Bakterienart(en) handeln. Auch Collembolen besitzen nicht nur im Darm, sondern auch in anderen Körperregionen Bakterien, wie molekularbiologische Untersuchungen der 16S rRNA zeigten (CZARNETZKI et al., 2003).

Bei der Bewertung der T-RFs müssen folgende Punkte beachtet werden:

- Eine Population bzw. Art muss mindestens mit 1 % in der Gesamtprobe vorhanden sein, um in einem Fingerprint detektiert zu werden (SMALLA, 2004).
- Die Diversität der Bakterienarten kann mit Hilfe der Fragmentflächen (Breite der Bande) oder Fragmenthöhen (Intensität der Bande) abgeschätzt werden. Dabei erweist sich meist die Fragmenthöhe als ein besserer Auswertungsparameter (DUNBAR et al., 2001), da es sich hierbei um eine gut reproduzierbare Größe

handelt. Die Fragmentflächen hingegen können unterschiedliche Anfangsbreiten besitzen und damit Schwankungen bei der Bewertung hervorrufen.

- Hinter jedem Peak (Fragment) verbirgt sich mindestens eine Bakterienart. Somit können auch mehrere meist monophyletische Gruppen hinter einem Peak erfasst werden (HORZ, 2000).
- Innerhalb eines T-RFs dürfen die relativen Abundanzen (quantitative Aussagen) zwischen den verschiedenen *O. nubilalis*-Populationen nicht überbewertet werden, da die Ausgangsmenge der Bakterien-DNA in der Template-Probe nicht bekannt war. Lediglich die *O. nubilalis*-DNA mit einer Menge von 0,08 ng/μl war bekannt. Die unterschiedlichen DNA-Mengen der Bakterien zwischen den Populationen können durch die einzeln durchgeführten Extraktionen und einer unterschiedlichen Menge von Darmgewebe zwischen den verschiedenen Tieren entstanden sein. LIU et al. (1997) weisen darauf hin, dass dies die sichtbare Abundanz zwischen den verschiedenen Populationen verzerrt. HORZ et al. (2000) geben an, dass Mengenverhältnisse von 1:100 dazu führen können, dass die um ein Hundertstel geringere DNA-Komponente nicht mehr detektiert werden kann. Weiterhin muss in Betracht gezogen werden, dass eine unterschiedliche Anzahl aktiver Operons für die rDNA zu verschiedenen Bandenintensitäten führen kann (KLAPPENBACH et al., 2000). Daher gingen in der vorliegenden Arbeit Fragmente, die kleiner als 1 % waren, nicht in die Auswertung ein.
- Die geringe Anzahl der T-RFs kann auch eine Folge von einer nicht speziellen Bakterien-Extraktion sein. Somit war keine komplette Lysis aller Bakterienzellen garantiert (AVANISS-AGHAJANI et al., 1994).

In den Untersuchungen zum Vergleich der **Bakterienspektren in Abhängigkeit von der Herkunft der Population** wurden acht *O. nubilalis*-Populationen herangezogen. Zwei der acht Populationen stammten aus einer Laborzucht. Die T-RFLP-Analyse ergab drei Bakterienfragmente mit großen Abundanzen und drei mit geringeren Abundanzen, die bei allen Populationen vertreten waren. Nur die Populationen aus dem Oderbruch und Bonn zeigten ein bzw. zwei populationspezifische Fragmente, die jedoch wenig Rückschlüsse auf eine Standort- bzw. Gruppenspezifität geben. Da die Populationen vom Feld und aus dem Labor das gleiche T-RFLP-Muster aufzeigten, kann es sich nur um häufige und ubiquitäre Bakterienarten handeln. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass bei den L5-Larven, durch die Entleerung des Darmes vor dem Beginn der Diapause bzw. die geringe Kontamination des künstlich hergestellten Mediums, nur ubiquitäre Bakterienarten erfasst

wurden. Weiterhin könnte auch, durch die für Bakterien untypische Dellaporta-Extraktion, eine geringere Anzahl an Bakterienarten extrahiert worden sein. Um die Mureinstruktur der Bakterienzellwände gut aufzulösen, wird häufig das bakteriolytische Enzym Lysozym verwendet, welche in der Dellaporta-Extraktion fehlt. Auch die Besiedlung der Wirtspflanzen und ihrer Organe beeinflusst die Darmflora von *O. nubilalis* dahingehend, dass in den Stängeln und Blättern im Vergleich zu der Rhizosphäre und den Wurzeln (BARAC et al., 2004; GERMAINE et al., 2004) eine geringere Mikrobenanzahl vorhanden ist. Somit nehmen die in den Stängeln fressenden *O. nubilalis*-Larven nur eine geringe Anzahl an Mikroben auf. Hingegen zeigten Untersuchungen von FREDERICK & CAESAR (2000) an den Schmetterlingslarven *Agapeta zoegana* eine größere Anzahl der Bakterienfragmente und eine höhere Abundanz der Bakterien bei den Feldtieren gegenüber den Labortieren mittels DGGE. Diese Larven ernähren sich allerdings im Boden von organischem Material und nehmen durch die stärkere Wechselwirkung von Umwelt und Flora bedeutend mehr Mikroorganismen als die *O. nubilalis*-Larven auf. Auch SMALLEY & OURTH (1979) konnten zwischen diapausierenden Feldtieren und Labortieren an den Käferlarven *Anthonomus grandis*, die sich vergleichbar mit *O. nubilalis* von oberirdischen Pflanzenteilen ernähren, klare Unterschiede im Fragment-Muster der Mikroorganismen aufzeigen. Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit nicht erfolgten Erfassung von standortspezifischen Bakteriengesellschaften konnte die Gruppierung der lokalen *O. nubilalis*-Populationen anhand von Bakterienspektren nicht gestützt werden. Wie jedoch in der Arbeit von CERVANTES et al. (2002) gezeigt wurde, sind zwischen den weit entfernten Standorten Mexiko und Deutschland deutliche Unterschiede in der Diversität von Mikrobengesellschaften in der Mais-Rhizosphäre bei gleichen Maissorten belegt worden. Da bekannt ist, dass Bakterien der Rhizosphäre den Stängel der Maispflanze besiedeln (GERMAINE et al., 2004), können diese von *O. nubilalis*-Larven aufgenommen und damit Teil ihrer Darmflora werden. Wenn die *O. nubilalis*-Larven weit vor der Diapause für die T-RFLP-Untersuchungen herangezogen werden, dann könnte auch zwischen Standorten geringerer Entfernung (innerhalb Deutschlands) möglicherweise eine Standort- und damit Populationsspezifität aufgezeigt werden. Die DNA dieser Larven steht jedoch dann nicht für die RAPD-PCR zur Verfügung, da die Mais-DNA als Verunreinigung der Template-DNA die RAPD-Muster von *O. nubilalis* primerabhängig verfälschen kann. Bei den Untersuchungen von FREDERICK & CAESAR (2000) ist es gelungen, anhand der Bakterienspektren von den im Boden lebenden Schmetterlingslarven *Agapeta zoegana*, die Standortspezifität zwischen den Standorten Montana und Colorado nachzuweisen.

4.3 Bedeutung der populations- und rassenspezifischen Analysen für die Abschätzung von Ursprung und Ausbreitung sowie der Gendrift von *O. nubilalis*

In der vorliegenden Arbeit wurde die derzeitige genetische Variabilität der lokalen deutschen *O. nubilalis*-Populationen erfasst. Diese genetische Variabilität, die eine Basis der Selektion auf *Bt*-Resistenz darstellen kann, stellt eine wichtige Voraussetzung für das Überleben von Populationen dar, wenn großflächig *Bt*-Mais angebaut wird. Anhand dieser genetischen Variabilität kann eine Resistenzausbreitung abgeschätzt werden. Da bisher noch keine Untersuchungen von *O. nubilalis*-Populationen mit Hilfe der RAPD-PCR vorliegen, konnte keine vergleichende Literatur herangezogen werden. In bisherigen molekularbiologischen Arbeiten über *O. nubilalis* wurden Biotypen mit Hilfe der RAPD-PCR (PORNKULWAT et al., 1998), Populationen und Rassen mittels ITS-I und II und mitochondrialer DNA (MARCON et al., 1999; COATES et al., 2001 aus: Datenbank AF349036) sowie von der Gattung *Ostrinia* die mtDNA (KIM et al., 1999) untersucht. In der Arbeit von KIM et al. (1999) stellte sich heraus, dass die taxonomische Klassifikation anhand der mtDNA nicht mit der Morphologie der Tibia übereinstimmte. Für die Charakterisierung der genetischen Variabilitäten der *O. nubilalis*-Populationen wurden mit den Larven molekulargenetische Analysen, von kodierenden und nichtkodierenden Bereichen der DNA mittels RAPD-PCR und von nichtkodierenden Bereichen der rDNA (ITS-1-Fragment), durchgeführt.

4.3.1 Art der Auswertung von RAPD-Mustern und ihre Validierung

Neben den in der vorliegenden Arbeit und häufig in der Literatur angewendeten **Ähnlichkeitskoeffizienten nach NEI & LI** (1979) werden ähnliche Algorithmen angewendet, die ebenfalls den relativen Anteil gemeinsamer Banden benutzen, um die genetische Distanz zu berechnen. Dazu gehören der DICE-Koeffizient (DICE, 1945), der z. B. beim Blattfleckenpilz *Septoria tritici* (SCHNIEDER et al., 1996) berechnet wurde und der Band-Sharing-Index (LYNCH, 1990), der z. B. bei der Mauereidechse *Podarcis muralis* (MÜLLER et al., 2002) angewandt wurde. Ein weiterer häufig eingesetzter Ähnlichkeitskoeffizient ist der Jaccard-Koeffizient, der in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zum Nei- & Li-Koeffizienten mit 93 % identische Dendrogramme erzeugte. Auch LOMBARD et al. (1999) erreichten in ihrer AFLP-Untersuchung eine hohe Korrelation von 99,6 % zwischen den Koeffizienten nach Jaccard und Nei & Li. In der vorliegenden Arbeit wurden in allen Dendrogrammen höhere Ähnlichkeitskoeffizienten

nach Nei & Li gegenüber Jaccard ermittelt. Von 14 Dendrogrammen war die Variabilität der Ähnlichkeitskoeffizienten, d. h. die Spanne der Ähnlichkeitskoeffizienten zwischen den Populationen, innerhalb eines Dendrogramms bei Jaccard mit $0,288 \pm 0,161$ geringfügig höher als bei Nei & Li mit $0,260 \pm 0,179$.

Die Ergebnisse der Cluster-Analyse, die einem **Bootstrap-Verfahren** unterzogen wurden, erreichten Werte zwischen 10 % und 100 % (angegeben nur Werte ≥ 50 %). Grundlage dafür waren 100 Pseudostichproben. In anderen Arbeiten wurde auf ein Bootstrap-Verfahren verzichtet, wie z. B. bei SIGURDSSON et al. (1999), LIM et al. (1999), BALLINGER-CRABTREE et al. (1992), HARDWICK et al. (1997), MARGARITOPOULOS et al. (2003), PORKULWAT et al. (1998), GALLUSSER et al. (2002b) und VANLERBERGHE-MASUTTI & CHAVIGNY (1998). Andere wiederum geben 500 Wiederholungen z. B. bei KIM et al. (1999), 1000 Wiederholungen z. B. bei NAGARAJU & GOLDSMITH (2002), MOYA et al. (2001) oder 2000 Wiederholungen bei KIRK et al. (2000) an. Die, wie in der vorliegenden Arbeit, verwendeten 100 Pseudostichproben sind z. B. beim Schmetterling *Phyllocnistis citrella* (ALVAREZ & HOY, 2003), der Schlupfwespe *Trichogramma* spp. (THOMSON et al., 2003) und der Mücke *Anopheles nuneztovari* (POSSO et al., 2003) durchgeführt worden. Um sichere Schlussfolgerungen zu treffen, sollten nach HEDGES (1992) 2000 Bootstrap-Wiederholungen durchgeführt werden, damit die Fehlerquote 1 % beträgt. In der vorliegenden Arbeit erfolgten, neben dem Bootstrap-Verfahren, dreijährige Wiederholungen der fünf Hauptstandorte und jeweils eine wiederholte Auswertung der Dendrogramme durch eine zweite Person (Auswertung 2). Eine ähnliche Art der Absicherung wurde in keiner entomologischen RAPD-Arbeit gefunden.

4.3.2 Bewertung der RAPD-Ergebnisse in Bezug auf Rassenunterscheidung

Bei der zusammenfassenden Bewertung aller deutschen Populationen aus drei verschiedenen Jahren mit Hilfe der RAPD-PCR können folgende Aussagen getroffen werden: Die Rassen von *O. nubilalis* grenzen sich, wie die RAPD-PCR und die Sequenzierung des ITS-1-Fragments zeigten, genetisch deutlich voneinander ab. Dies bestätigen auch Untersuchungen von MEISE (pers. Mitt., 2003), der durch RAPD-PCR-Analyse von je zwei Lokalpopulationen der E- und Z-Rasse (jeweils 5 Einzeltiere) eine Trennung der beiden Rassen aufzeigen konnte. Demgegenüber konnten MARCON et al. (1999) mittels Sequenzierung des ITS-1-Fragments keine Rassenunterscheidung von *O. nubilalis* vornehmen. REINICKE et al. (1999) wiesen darauf hin, dass eine Rassendiagnose mittels RAPD-PCR bei heterozygoten natürlichen Schwammspinner-Populationen nur

bedingt einsetzbar ist, da diese Methode keine Unterscheidung zwischen homo- und heterozygoten Individuen zulässt.

4.3.3 Qualitative Bewertung der RAPD-Ergebnisse

Für das Heranziehen charakteristischer Merkmale von Lokalpopulationen wurde ein „qualitativer“ Ansatz durchgeführt. Die RAPD-Muster über drei Jahre zeigten für sechs Lokalpopulationen spezifische Markerbanden, sogenannte diagnostische Banden. Besonders auffällig war dabei die hohe Anzahl populationspezifischer RAPD-Banden bei der Lokalpopulation Niedernberg. Dies könnte damit erklärt werden, dass in diesem Gebiet vor längerer Zeit eine erhöhte Hybridisierung der Z-Rasse mit der E-Rasse stattgefunden hat und ein Teil der genetischen Konstitution der E-Rasse sich noch heute in der Z-Rasse wiederfindet. Die Möglichkeit der Hybridisierung beschreibt auch LANGENBRUCH et al. (1985), indem er ein Vorkommen von Hybriden in den USA und in Italien zitiert. Auch LORENZ (1993) betont die Möglichkeit der Hybridisierung von Z- und E-Rasse, die jedoch aufgrund der kurzen Zeit des gleichzeitigen Auftretens von Faltern beider Rassen für die Populationsstruktur scheinbar ohne Bedeutung ist. Auch beim Fransenflüglers *Aeolothrips intermedius* wurde bei der Bestimmung der genetischen Variation innerhalb einer Population und zwischen den Populationen bei einem Primer eine populationspezifische Bande für den ungarischen Standort Valkó identifiziert, der sich von dem ebenfalls ungarischen Standort Nagykovácsi unterschied (BAYAR et al., 2001). KRAUS et al. (1998) konnten ebenfalls mit einem Primer eine Unterscheidung der Thrips-Populationen *Frankliniella occidentalis* zwischen Standorten in der Schweiz und in Australien vornehmen, indem nur bei der Schweizer Population eine Bande bei ca. 1750 bp auftrat. Keine diagnostischen Banden fanden sie zwischen den Populationen von *Thrips tabaci*. DOWNIE (2000) zeigte mit zwei Primern wirtspflanzenspezifische Banden der Rebläuse *Daktulosphaira* spp.

4.3.4 Quantitative Bewertung der RAPD-Ergebnisse

Neben dem „qualitativen“ Ansatz wurde ein „quantitativer“ Ansatz durchgeführt, der eine Auswertung der RAPD-Muster über die Berechnung der genetischen Ähnlichkeiten aller Banden vornahm. Die RAPD-Untersuchungen konnten aufzeigen, dass die Einzeltiere **innerhalb einer Lokalpopulation** untereinander eine hohe genetische Variabilität besaßen. So wiesen die Einzeltiere innerhalb einer Lokalpopulation eine genetische

Ähnlichkeit von 46 % auf, während Tiergruppen einer Lokalpopulation Ähnlichkeitswerte um 70 % besaßen. Die Reduzierung der hohen genetischen Variabilität zwischen Individuen wird durch eine Mischung von mehreren individuellen Template-DNAs erzielt. Somit sollte eine Lokalpopulation durch Mischung von 15 bis 40 Individuen beschrieben werden. Bei einer zu hohen Anzahl an Individuen besteht die Gefahr, nur noch artspezifische Banden zu erhalten. GALLUSSER et al. (2002b) wiesen ebenfalls darauf hin, dass bei den sieben Populationen der Schmetterlingsart *Oleria onega*, durch die große Heterogenität zwischen den Einzeltieren, eine Zugehörigkeit der Einzeltiere zu ihren jeweiligen Populationen nicht möglich war. Für ihre Einzeltieruntersuchungen verwendeten sie, im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit, 2 - 18 statt fünf Individuen pro Population und sieben statt fünf Primer.

Die jährlichen genetischen Variabilitäten bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Lokalpopulationen Oderbruch, Hessisches Ried und Pocking könnte auf ungerichtete Mutationen und Rekombinationen oder eine gerichtete Selektion zurückzuführen sein. Da innerhalb eines Standortes über alle drei Jahre keine erheblichen klimatischen Schwankungen (Abb. 9) bestanden, haben diese scheinbar nur einen geringen Einfluss auf die genetische Variabilität ausgeübt. Die Erstellung der Dendrogramme hat gezeigt, dass aufgrund der jährlichen Variabilitäten eine sichere Auswertung der RAPD-Muster nur über eine große Anzahl an Banden und über einen mehrjährigen Zeitraum gegeben ist. Dies zeigt der Vergleich zwischen den Dendrogrammen der einzelnen Jahre zu der Gesamtauswertung über die Jahre 1999 – 2001. Während die beiden auswertenden Personen (Auswertung 1 und 2) in den einzelnen Jahren nur ähnliche Dendrogramm-Strukturen erhielten, wurden bei der Gesamtauswertung (alle drei Jahre zusammen) identische Dendrogramme erzielt. In der Literatur wurde keine RAPD-Arbeit mit zwei unabhängigen Auswertungen gefunden. Die jährlichen Veränderungen in der genetischen Populationsstruktur blieben jedoch in den meisten Fällen (Ausnahme Oderbruch 1999) ohne Auswirkung auf den Vergleich zwischen den Populationen, da die genetische Variabilität innerhalb der Lokalpopulationen geringer war als zwischen den Lokalpopulationen (Tab. 41). Dies wird sowohl durch die F-Werte (F_{intra} , F_{inter}), die die Ähnlichkeit ausdrücken und auch homogene Banden erfassen, als auch durch die H_S - und H_T -Werte, die die Heterozygotität aufzeigen, ausgedrückt. Die Tabelle 41 stellt die Ergebnisse aus den Abschnitten 3.2.3.1 und 3.3.3.2 zusammen.

Tab. 41: F-Statistik von *Ostrinia nubilalis* – Vergleich der intra- und interpopulationsgenetischen Ähnlichkeit zwischen Einzeltieren aus einem Jahr und Tiergruppen aus drei Jahren basierend auf den Angaben in Tab. 24 und 31

Objekt	F _{intra}	F _{inter}	H _T	H _S	F _{ST}
Einzeltiere n = 5	0,46	0,34	0,345	0,272	0,212
Tiergruppen 3G, n = 20	0,70 ¹	0,46 ² bzw. 0,61 ³	0,348	0,200	0,425

F_{intra}: Anteil gemeinsamer Banden in einer Population; F_{inter}: Anteil gemeinsamer Banden in einer Art; H_T: durchschnittliche Heterozygotität einer Art; H_S: durchschnittliche Heterozygotität einer Lokalpopulation; F_{ST}: Fixierungsindex, gibt die Abnahme der Heterozygotität aller Lokalpopulationen bezogen auf die gesamte Art an; ¹ = Mittelwert von allen intrapopulationsspezifischen Werten aus Tab. 31; ² = Einfluss der Jahre; ³ = ohne Einfluss der Jahre

Die geringere genetische Variabilität innerhalb einer Lokalpopulation im Vergleich zu **verschiedenen Lokalpopulationen** wird sowohl bei den Einzeltieren als auch den Tiergruppen deutlich. So nimmt die Bandenähnlichkeit zwischen den Einzeltieren von 46 % auf 34 % und bei den Tiergruppen von 70 % auf 61 % (ohne Einfluss der Jahre) bzw. 46 % (Einfluss der Jahre) ab (Tab. 41). Die H_T-Werte sind sowohl bei den Einzeltieren als auch bei den Tiergruppen größer als die H_S-Werte. Eine ebenfalls höhere genetische Ähnlichkeit innerhalb einer Population gegenüber verschiedenen Populationen wurde auch bei der Weißen Fliege *Bemisia tabaci* (ABDULLAHI et al., 2003), der Grünen Gurkenlaus *Aphis gossypii* (VANLERBERGHE-MASUTTI & CHAVIGNY, 1998), dem Grashüpfer *Melanoplinae* spp. (CHAPCO et al., 1992) und bei der Blattlaus *Sitobion avenae* (STILMANT et al., 1997) festgestellt. Demgegenüber zeigten der Schmetterling *Oleria onega* (GALLUSSER et al., 2002b), die Mücke *Anopheles nuneztovari* (POSSO et al., 2003) und die Kiefernbuschhornblattwespe *Diprion pini* (BAUMANN et al., 2003) innerhalb einer Population eine größere Variabilität als zwischen den Populationen. Dies erklärten die Autoren damit, dass eine hohe Genflussrate zwischen den Populationen besteht. Auch die Reblaus *Daktulosphaira vitifoliae* wies zwischen den Standorten eine geringere Variabilität auf als zwischen verschiedenen Weinstöcken oder Weinsorten innerhalb eines Standortes (DOWNIE, 2000). Bei der Brackwespe *Agathis* spp. wurde die höhere Variabilität innerhalb einer Population gegenüber verschiedenen Populationen mittels mtDNA ermittelt, die möglicherweise eher auf eine derzeitige Kolonisierung zwischen den großen Lokalpopulationen basiert als auf einen hohen Genfluss (ALTHOFF & THOMPSON, 2001).

Neben dem Anteil gemeinsamer Banden (F) wurden in der vorliegenden Arbeit auch die **Heterozygotitäten** durch den F_{ST} -Wert sowohl von Einzeltieren als auch von Tiergruppen (gepoolte Tiere vor der Extraktion) ermittelt:

Einzeltiere: F_{ST} -Werte 0,212 bei einer Anzahl von 20 Individuen, vier Populationen, 5 Individuen/Population, 5 Primer mit 96 Banden

Tiergruppen: F_{ST} -Werte 0,425 bei einer Anzahl von 60 Individuen, drei Populationen, 20 Individuen/Population, 3 Primer mit 40 Banden

Die F_{ST} -Werte zeigten bei den Einzeltieren eine große Differenzierung und bei den Tiergruppen eine sehr große Differenzierung zwischen den Populationen. Dies bedeutet, dass die Populationen durch die geographische Separation allgemein einen geringen Genfluss besitzen. Weiterhin machen die um 50 % geringeren F_{ST} -Werte der Einzeltiere gegenüber den Tiergruppen deutlich, dass die Analyse von Einzeltieren wegen ihrer höheren individuellen Variabilität eine geringere Populationsdifferenzierung aufzeigt als die von Tiergruppen. Da die H_T -Werte zwischen den Einzeltieren aus einem Jahr nahezu identisch sind mit den H_T -Werten der Tiergruppen aus verschiedenen Jahren (Tab. 41), scheint der jährliche Einfluss auf die F_{ST} -Werte gering zu sein. In kaum einer RAPD-Arbeit wurde die genetische Variabilität über mehrere Jahre untersucht. Beim Parasitoiden *Diaeretiella rapae* wurden die F_{ST} -Werte über zwei Jahre (VAUGHN & ANTOLIN, 1996) und beim Schmetterling *Helicoverpa zea* mittels Alloenzym-Analyse über drei Jahre bestimmt (HAN & CAPRIO, 2002). Dabei wurde bei *D. rapae* eine geringe Heterozygotität von 0,066 – 0,073 und bei *H. zea* eine noch geringe Heterozygotität von 0,0002 bis 0,0072 über die Generationen bzw. Jahre ermittelt. Diese Ergebnisse sind mit dem Ergebnis aus der vorliegenden Arbeit insofern schwer zu vergleichen, da die F_{ST} -Werte jährlich ermittelt wurden und nicht wie in der vorliegenden Arbeit nur einen F_{ST} -Wert über alle drei Jahre berechnet wurde.

In keiner entomologischen RAPD-Arbeit wurde ein F_{ST} -Wert mit Tiergruppen aufgezeigt, da stets nur Einzeltiere die Grundlage bildeten. Daher ist es schwierig, die Ergebnisse der Tiergruppen mit den F_{ST} -Werten aus der Literatur zufriedenstellend zu vergleichen. Einen ähnlich hohen F_{ST} -Wert von 0,469 allerdings anhand von Einzeltieren zeigte *Marchalina hellenica* (MARGARITOPOULOS et al., 2003). Die ermittelten F_{ST} -Werte der Einzeltiere sind am ähnlichsten mit dem Fixierungsindex (F_{ST}) der Schmetterlingsart *Boloria aquilonaris* von VANDEWOESTIJNE & BAGUETTE (2002) mit 0,163, die pro Population 6 – 26 Individuen testen (Tab. 42). Auch die genetische Diversität über alle RAPD-Loci mit 0,402

$\pm 0,214$ ist mit der genetischen Diversität von *O. nubilalis* von $0,345 \pm 0,132$ vergleichbar. Das bedeutet, dass bei *Boloria aquilonaris* ca. 40 % und bei *O. nubilalis* ca. 35 % der Loci sich zwischen allen RAPD-Genotypen der Populationen unterscheiden. Eine andere Schmetterlingsart *Oleria onega* zeigte durch einen bedeutend höheren Fixierungsindex von $0,328$ eine sehr große genetische Differenzierung zwischen den Populationen, obwohl andererseits eine geringere Variabilität zwischen den Populationen als innerhalb einer Population vorlag (GALLUSSER et al, 2002b). Weitere Beispiele für die Bestimmung des Fixierungsindex bei entomologischen RAPD-Arbeiten sind in der Tab. 42 aufgeführt, bei der *Aphis gossypii* den geringsten und *Bemisia tabaci* den größten Fixierungsindex aufwies. Da die Empfehlung von LYNCH & MILLIGAN (1994), mindestens 100 Individuen pro Population zu testen, weder in der vorliegenden Arbeit noch in den von Tab. 42 erfüllt wurde, sind diese F_{ST} -Werte einerseits mit Vorsicht zu betrachten. Andererseits könnte durch eine zu hohe Anzahl an Individuen, die Populationsspezifität vermindert werden. Daher ist in den Voruntersuchungen zu testen, welche Mindestzahl an Individuen erforderlich ist, um die Population ausreichend zu erfassen. So zeigten die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Optimierungen (3.2.3.2), dass bei einer Poolung von Einzeltier-DNA-Extrakten sich das RAPD-Muster ab 20 Larven kaum ändert und damit die Populationsspezifität erfasst wurde. Eine weitere Empfehlung von LYNCH & MILLIGAN (1994), eine gleiche Anzahl an Individuen zwischen den zu vergleichenden Populationen einzusetzen, wurde in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt. In der Literatur wird jedoch auch diese Empfehlung, wie in Tab. 42 deutlich wird, kaum angenommen. Weiterhin geben LYNCH & MILLIGAN (1994) an, dass für die Erstellung des F_{ST} -Wertes bei RAPD-Untersuchungen zwei bis zehnfach mehr Individuen benötigt werden als bei Alloenzym-Untersuchungen, da die Bestimmung der Genfrequenz bei dominanten Markern ungenauer ist als bei codominanten Markern. Die Erfassung der Mutationsrate ist jedoch bei der RAPD-PCR mit $10^{-4} - 10^{-6}$ pro Locus und Generation höher als bei den Alloenzymen mit $10^{-6} - 10^{-9}$ (LOUGHEED et al., 2000).

Tab. 42: F_{ST} -Werte aus RAPD-Untersuchungen verschiedener Insektenarten

Art	N	P	N/P	Primer	Banden	F_{ST}	Literaturquelle
<i>Boloria aquilonaris</i> (Lepidoptera)	110	8	6-26	4		0,163	VANDEWOESTIJNE & BAGUETTE, 2002
<i>Oleria onega</i> (Lepidoptera)	80	7 aus 2 Arten	2 – 18	7	92	0,328	GALLUSSER et al., 2002b
<i>Diprion pini</i> (Hymenoptera)	140	5	28	9	17	0,159	BAUMANN et al., 2003
<i>Anopheles nuneztovari</i> (Diptera)	119	3	ca. 40	10	65	0,035-0,08	POSSO et al., 2003
<i>Bemisia tabaci</i> (Homoptera)	336	6	56	11	112-163	0,49 (♂) - 0,54 (♀)	MOYA et al., 2001
<i>Marchalina hellenica</i> (Homoptera)	75	6	9 – 16	3	35	0,469	MARGARITOPOULOS et al., 2003
<i>Daktulosphaira vitifoliae</i> (Homoptera)	30- 60	10	3 - 6	13	48	0,052	DOWNIE, 2000
<i>Aphis gossypii</i> (Homoptera)	360 - 900	18	20- 50	3	37	0,0367 0,018	VANLERBERGHE- MASUTTI & CHAVIGNY, 1998

N = Anzahl der Einzelindividuen; P = Population; F_{ST} = Fixierungsindex, gibt die Abnahme der Heterozygotität aller Lokalpopulationen bezogen auf die gesamte Art an; (♂) – Männchen; (♀) – Weibchen

Eine noch größere Anzahl an F_{ST} -Werten finden sich in populationsgenetischen Arbeiten mittels Alloenzym-Elektrophoresen, z. B. bei Schmetterlingen wie *Epirrita* spp. (WYNNE et al., 2003), *Spodoptera frugiperda* (PASHLEY et al., 1985) und *Helicovera zea*, *H. virescens* (HAN & CAPRIO, 2002). Diese sind jedoch nur zu 55 % mit den F_{ST} -Werten aus RAPD-Untersuchungen vergleichbar, wie eine Zusammenstellung der genetischen Diversität von 11 Veröffentlichungen in der Arbeit von VANDEWOESTIJNE & BAGUETTE (2002) zeigte. Bei den restlichen Prozenten waren die F_{ST} -Werte bei der RAPD-PCR überwiegend größer als bei den Alloenzymen. Die genetische Diversität (Mutationsrate) war mit einer Mehrheit von 67 % bei den RAPD-Loci höher als bei den Alloenzym-Loci. Weiterhin ist zu beachten, dass Alloenzyme (funktionelle Enzyme) stärker konserviert sind und daher bei Populationsstudien häufig mehr die „historische“ Situation als den derzeitigen aktuellen Zustand repräsentieren, so bspw. bei den Schmetterlingen der Gattung *Epirrita* (WYNNE et al., 2003) und bei *Boloria aquilonaris* (VANDEWOESTIJNE & BAGUETTE, 2002). Die RAPD-PCR hingegen kann einerseits mehr die derzeitige

genetische Situation (VANDEWOESTIJNE & BAGUETTE, 2002) charakterisieren und andererseits auch für phylogenetische Analysen eingesetzt werden (WILLIAMS et al., 1993), so z. B. bei Blattläusen (PUTERKA et al., 1993) und Mücken (KAMBHAMPATI et al., 1992).

4.3.5 Metapopulationen von *O. nubilalis*

Anhand der RAPD-Ergebnisse von neun Populationen und aufgrund von ähnlichen geographischen, topographischen, klimatischen und ackerbaulichen Bedingungen konnten vier Gruppen identifiziert werden. Im Folgenden soll die Frage diskutiert werden ob es sich bei diesen Gruppen von Lokalpopulationen um Metapopulationen handelt. Die Metapopulation ist neben der Lokalpopulation und der geographischen Population eine von drei Beschreibungen der Populationsstruktur zur Charakterisierung der räumlichen Ökologie (HANSKI & GILPIN, 1991). Die Metapopulationsökologie ordnet sich zwischen der theoretischen und der landschaftlichen Ökologie ein und stellt eine vereinfachte Form der landschaftlichen Ökologie dar (HANSKI, 1998). Metapopulationen sind Gruppen von lokalen Populationen, die Individuen über ungünstige Habitate austauschen (BAGUETTE et al., 2000). Dadurch wird eine bessere Fähigkeit zum Überleben lokaler Populationen erlangt. Nach REICH & GRIMM (1996) ist „eine Metapopulation eine (regionale) Population von (lokalen) Populationen, wobei folgende Bedingungen erfüllt sein müssen:

1. die lokalen Populationen besitzen eine eigene Dynamik, d. h. sie sind von anderen lokalen Populationen abgrenzbar;
2. wenigstens einige der lokalen Populationen sind so klein oder so bedroht, dass früher oder später mit ihrem Aussterben zu rechnen ist;
3. die lokalen Populationen bzw. Habitate stehen durch dispergierende Individuen miteinander in Wechselwirkung;
4. dispergierende Individuen müssen in der Lage sein, infolge Aussterbens einer Lokalpopulation leer gewordene Habitate wiederzubesiedeln bzw. neu entstandene Habitate zu besiedeln, d. h. Populationen aufzubauen, die ihrerseits Kolonisatoren bereitstellen können.“

Zu 1. Bei der Einteilung der lokalen Populationen in Metapopulationen dürfen klimatische Gegebenheiten zwar ähnlich sein, aber nicht synchronisieren (CONRADI, 2000). So liegen, wie im Ergebnisteil 3.3.6 beschrieben, zwischen den Lokalpopulationen zwar ähnliche klimatische Verhältnisse vor, aber dennoch weist jeder Standort seine eigene Charakteristik auf. Diese grenzt sich durch eigene geographische, topographische,

klimatische und ackerbauliche Merkmale von anderen Lokalpopulationen ab. Die Lebensräume von *O. nubilalis* werden überwiegend durch fragmentierte Kulturlandschaften, wie Maisanbauregionen, mit eigener Dynamik beschrieben, die durch Gebiete mit geringem Maisanbau getrennt werden. Daher handelt es sich bei den lokalen *O. nubilalis*-Populationen überwiegend um diskrete Habitatinseln, die damit als Metapopulation angesprochen werden können. Zwischen den Populationen Freiburg und Karlsruhe hingegen befindet sich eine mehr kontinuierliche Kulturlandschaft mit starkem Maisanbau (Abb. 7), so dass hier keine eindeutige Metapopulation vorliegen dürfte.

Zu 2. Für eine genaue Analyse der Metapopulation bei kleinen Populationen in fragmentierten Gebieten ist die Populationsgröße zwischen verschiedenen Standorten und das Geschlechterverhältnis von einer Generation zur nächsten Generation von Bedeutung (SCHTICKZELLE et al., 2002). Da es sich bei den untersuchten *O. nubilalis*-Populationen um große Individuenzahlen handelt, sind diese Angaben für die Persistenz von geringer Bedeutung. Daher wurden diese Daten in der vorliegenden Arbeit nicht erhoben. Für den Standort Oderbruch kann von einer Populationsgröße von mehreren Millionen Tieren ausgegangen werden. Bei den anderen etablierten Populationen sind geringere Individuenzahlen von mehreren hunderttausend Individuen anzunehmen, da durch kleinere Maisfelder und starkes Pflügen ein Anstieg der Abundanz begrenzt wird. Damit wird deutlich, dass es sich bei *O. nubilalis* um eine zur Massenvermehrung neigende (gradierende) Art handelt. Da jedoch zwischen großen und sicheren Habitaten (*mainlands*), wie z. B. Oderbruch und Halle, kleine, unsichere Habitate (*islands*) existieren, die durch intensives Pflügen aussterben können, handelt es sich bei den *O. nubilalis*-Populationen per Definition nach REICH & GRIMM (1996) um Metapopulationen. Bei dem kalifornischen Schreckenfaller *Euphydryas editha bayensis* wurde eine unterschiedliche Dynamik beschrieben. Ein sehr großes Habitat (*mainland*) von über 500 000 Individuen zeigte im Untersuchungszeitraum kein Aussterben der lokalen Population, wohingegen kleinere Populationen aus *island*-Habitaten von 10 – 400 Individuen mehrmals verschwanden (GRIMM & REICH, 1996). Solche unterschiedlichen Dynamiken für *mainland*- und *island*-Populationen treten wahrscheinlich auch bei *O. nubilalis* auf.

Da das Konzept der Metapopulation aus Sicht des Naturschutzes entwickelt wurde und somit nur vom Aussterben bedrohte Arten untersucht, könnte dies für Schädlinge wie dem *O. nubilalis* modifiziert werden, um Effekte von insektenresistenten Wirtspflanzen zu untersuchen. So können bei einem großflächigen Anbau von *Bt*-Mais weitere Populationen

aus *island*-Habitaten zwischen den *mainland*-Habitaten aussterben, da die Anzahl der migrierenden Individuen erheblich abnimmt.

Zu 3. Die Berechnung der F_{ST} -Werte ergab eine große bis sehr große genetische Differenzierung der lokalen Populationen aus verschiedenen Metapopulationen. Daraus wurde ein Relativwert für migrierende Individuen (Nm) abgeschätzt, der zwischen den Lokalpopulationen einen geringen Genfluss mit 1 Migranten/Jahr bzw. 1 Migranten in jeder 4. Generation angibt und damit die Anforderung an das Metapopulationskonzept erfüllt. Bei der Migration (aktive Verbreitung) spielt die Mobilität der jeweiligen Art eine große Rolle. So können *O. nubilalis*-Falter Entfernungen von überwiegend 200 m (wenige von 800 m bis zu 3,2 km) pro Nacht zurücklegen (SHOWERS et al., 2001). Da jedoch in den Untersuchungen von ZWÖLFER (1928) starke Unterschiede in den Befallsstärken zwischen den Populationen auftraten, folgerte er, dass die Hauptmasse der Zünsler kaum weite Strecken zurücklegen (CAFFREY & WORTHLEY, 1922 zitiert in: ZWÖLFER, 1928a). Seine Schlussfolgerungen, dass *O. nubilalis* eine geringe Migration hat, decken sich mit den Migrationswerten aus der vorliegenden Arbeit. Allerdings könnte die tatsächliche Migration höher als die berechnete sein, da nach VANDEWOESTIJNE & BAGUETTE (2002) und POSSO et al. (2003) hohe Mutationsraten bei RAPD-Markern zu geringeren F_{ST} -Werten führen. So bilden Flugstrecken der *O. nubilalis*-Falter von 32 km nach FLACKE (1982) und von 23 km – 49 km in wenigen Nächten nach SHOWERS et al. (2001) keine großen Ausnahmen von nur wenigen Individuen. Die Größe der Falter ist meist kein guter Indikator für die Mobilität, wie zwischen den Schmetterlingsarten *Melanargia galathea* (kleiner, fliegt längere Distanzen) und *Aporia crataegi* von BAGUETTE et al. (2000) festgestellt wurde. Vielmehr spielen zufällige Verfrachtungen durch Luftströmungen, wie Isotherme, eine Rolle (SHOWERS et al., 1995). Ein weiterer passiver Verbreitungsvorgang erfolgt durch die Hauptwindrichtung. In Deutschland besteht zur Zeit des Falterfluges meist eine (nord)westliche Windrichtung. Für drei Populationen wurde die Hauptwindrichtung im Juni/Juli aus den Jahren 1991 - 2001 dargestellt (Abb. 56). Daraus wird deutlich, dass eine Migration von Faltern aus dem Oderbruch in die Region um Halle selten möglich ist. Daher ist eher eine Migration von Halle in das Oderbruch anzunehmen. Die Population Pocking wird aufgrund der (nord)westlichen Hauptwindrichtung einen geringen Genfluss zu anderen deutschen Populationen ausüben.

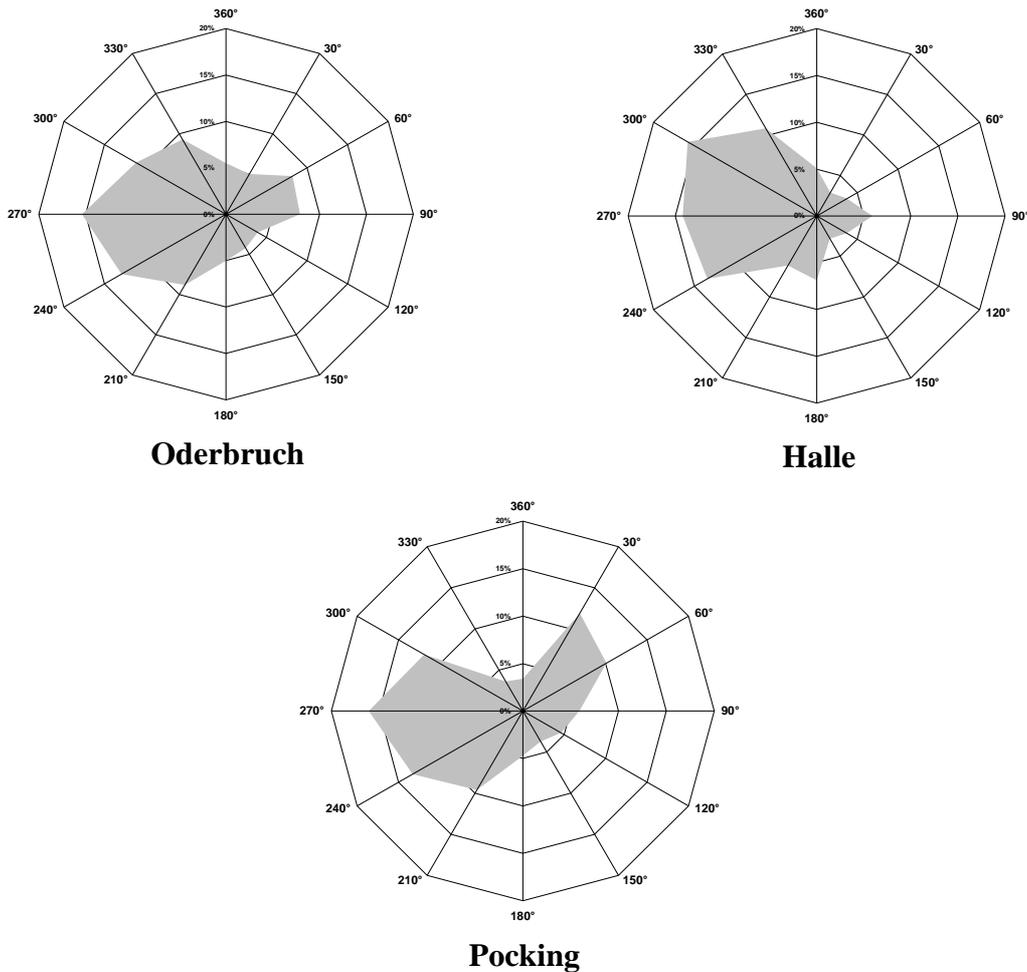


Abb. 56: Langjähriges Mittel der Hauptwindrichtung von den drei Befallsgebieten Oderbruch, Halle und Pocking des Maiszünslers *O. nubilalis* aus den Jahren 1991 bis 2001 der Monate Juni und Juli

Im ersten Punkt der Metapopulationsbedingung wurde der Lebensraum von *O. nubilalis* als fragmentiertes Habitat dargestellt. In der Arbeit von MENNECHEZ et al. (2003) konnte gezeigt werden, dass fragmentierte Habitate des Schmetterlings *Procllossiana eunomia* eine höhere Ausbreitung ermöglichen als kontinuierlich besiedelte Gebiete und das weibliche Tiere längere Distanzen zurücklegten. Deshalb könnte auch für *O. nubilalis* angenommen werden, dass durch die fragmentierten Habitate eine stärkere Ausbreitung begünstigt wird. Die Populationen von *O. nubilalis* stehen einerseits durch aktive und passive Verbreitungswege miteinander in Wechselwirkung, werden aber andererseits durch die teilweisen großen Entfernungen zwischen den Feldern mit geringem Maisanbau an einer bedeutenden Migration gehindert.

Zu 4. Die bisher von *O. nubilalis* besiedelten Regionen sind potentiell in der Lage Kolonisatoren bereitzustellen. Da *O. nubilalis* in der Lage ist andere Habitate zu erreichen und auch bei fehlendem Maisanbau zunächst kleine Populationen an anderen Pflanzenarten

zu etablieren, kann nicht von einer *source-sink*-Situation gesprochen werden (GRIMM & REICH, 1996). Bei dieser erreichen zwar Individuen andere Habitate, aber es gelingt ihnen dort nicht Populationen zu etablieren. Da *O. nubilalis* Kolonisatoren für zukünftige große Populationen bei einem zunehmenden Maisanbau bereitstellt, sind die Gruppen der Lokalpopulationen als Metapopulationen anzusprechen.

Da alle Bedingungen nach REICH & GRIMM (1996) erfüllt werden, können die vier Gruppen der neun Populationen zu vier Metapopulationen zusammengefasst werden.

4.3.6 Manteltest

Ob die Ursachen der hohen genetischen Ähnlichkeiten zwischen allen Lokalpopulationen (Totalpopulation) auf geographische, topographische und/oder klimatische Gegebenheiten zurückzuführen sind, sollte der Manteltest (Mantel, 1967) zeigen. Anhand der RAPD-Ergebnisse wurde daher versucht, nach der Theorie der Isolation durch Distanz (WRIGHT, 1943) einen Zusammenhang zwischen den genetischen Ähnlichkeiten aller Lokalpopulationen und ihren geographischen Distanzen herzustellen. Dabei zeigte sich, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen der genetischen und geographischen Distanz besteht. Auch bei der parasitoiden Brackwespe *Agathis* spp. konnte kein Zusammenhang zwischen der Isolation von Populationen und der geographischen Distanz gefunden werden, die durch eine große räumliche Verteilung der Populationen erklärt wurde (ALTHOFF & THOMPSON, 2001). Demgegenüber konnte eine geringe Korrelation zwischen geographischer und genetischer Distanz mit $r = -0,17$, $P = 0,003$ bei der Reblaus *Daktulosphaira vitifoliae* (DOWNIE, 2000) und eine hohe Korrelation mit $r = 0,666$, $P < 0,01$ bei dem Schmetterling *Boloria aquilonaris* (VANDEWOESTIJNE & BAGUETTE, 2002) gefunden werden.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation zwischen der genetischen Ähnlichkeit und der topographischen Höhe in NN sowie der Temperaturdifferenz mittels Manteltest aufgezeigt werden. Demgegenüber konnte LORENZ (1993), durch die Bestimmung des Schlupftermins von *O. nubilalis*-Populationen, die Bildung von Temperaturrassen nachweisen, da die Postdiapauselarven aus kühleren Klimagebieten eine geringere Wärmesumme zum Schlupf benötigten. In der vorliegenden Arbeit konnte eine negative Korrelation mit $r = -0,43$ bis $-0,47$ zwischen den Niederschlagsdifferenzen (Sommer, Winter, Jahr) und den genetischen Ähnlichkeiten ermittelt werden. Das bedeutet, dass die genetische Ähnlichkeit zwischen den Populationen mit größerer

Niederschlagsdifferenz abnimmt. Bei der Eliminierung des Standortes Bodensee, der hohe Niederschläge und große genetische Unterschiede zu den anderen Populationen aufwies, konnte diese Korrelation nicht aufrechterhalten werden. Daraus kann gefolgert werden, dass kein zwingender Zusammenhang zwischen den Niederschlägen und den genetischen Ähnlichkeiten besteht. Somit können die hohen genetischen Ähnlichkeiten zwischen allen Lokalpopulationen nicht durch geographische und klimatische Verhältnisse gestützt werden, sondern eher durch einen gemeinsamen Ursprung.

Eine weitere Möglichkeit - hoher Genfluss - wurde durch die ermittelten F_{ST} -Werte ausgeschlossen. Demgegenüber kamen MARCON et al. (1999), die ITS-1- und mtDNA-Untersuchungen von *O. nubilalis*-Populationen durchführten, zu der Vermutung, dass die hohe genetische Ähnlichkeit durch Genfluss zwischen weit entfernten Populationen hervorgerufen wird, der durch Luftströmungen verursacht wird. Nur in wenigen RAPD-Arbeiten wurden ergänzende klimatische Informationen erhoben und zusammen mit den genetischen Distanzen ausgewertet. Ein Beispiel dafür liefern die Schmetterlingsunterarten *Oleria onega agarista* und *Oleria onega* ssp., bei denen mit Hilfe von GIS- und georäumlichen Analysen die Parameter Temperatur, Feuchtigkeit, Topographie und Ackerbau dahingehend untersucht wurden, in welchen Bereichen dieser Parameter die meisten Schmetterlinge zu finden sind (GALLUSSER et al., 2002a). Daraus können nach ihren Aussagen Austauschbewegungen von Populationen und Arten vorausgesagt werden. Diese topographischen und klimatischen Erhebungen wurden jedoch ohne Bezug zu ihren RAPD-Ergebnissen durchgeführt, so dass ein Vergleich zu den Ergebnissen aus dieser Arbeit nicht vorgenommen werden konnte.

Für phylogenetische Aussagen werden hauptsächlich Alloenzyme herangezogen, da diese mehr „konservierte“ Polymorphismen gegenüber den DNA-Sequenzen aufdecken. NEI (1988) hingegen empfiehlt für evolutionsbiologische Fragestellungen DNA-Sequenzen, da diese mehr genetische Informationen liefern als Proteine. Nur in wenigen Arbeiten (Blattläuse - PUTERKA et al., 1993; Mücken – KAMBHAMPATI et al., 1992) wird die RAPD-PCR herangezogen, um eine Aussage über die Abstammung und Ausbreitung einer Organismengemeinschaft zu treffen, da diese nur die gegenwärtigen Strukturen aufzeigen kann. Da jedoch die Ausbreitung der Z-Rasse in Deutschland erst vor wenigen Jahrzehnten erfolgte, kann die RAPD-PCR sowohl die vergangenen als auch die gegenwärtigen Strukturen besser erfassen, als dies bspw. mit Alloenzymen möglich wäre. Im folgenden Abschnitt wird anhand der vorliegenden Ergebnisse über *O. nubilalis* zusammen mit den

Ergebnissen aus der Literatur eine theoretisch mögliche **Ausbreitung von *O. nubilalis*** für Deutschland beschrieben.

O. nubilalis, die ihr Ursprungsgebiet in den asiatischen Steppengebieten haben (ZWÖLFER, 1928b), spalteten sich nach den vorliegenden TGGE-, Sequenzierungs- und RAPD-Ergebnissen und nach den Schätzungen von MARCON et al. (1999) vor über 60 000 Jahren in zwei Rassen. Die E-Rasse, die vermutlich gut an den aus den russischen Steppengebieten stammenden Beifuss *Artemisia vulgaris* angepasst war, verbreitete sich mit ihm über Europa. Mit der zunehmenden Kultivierung von Mais und der intensiveren Landwirtschaft verursachte dieser polyphage Zünsler auch Schäden an Hanf, Hopfen u. a. Kulturpflanzen. Ausgehend von den Befallsgebieten in Asien und später auf dem Balkan kam die Z-Rasse von *O. nubilalis* vermutlich erst vor über 100 Jahren entlang der Donau nach Deutschland. Auf diesem Weg haben sich einige Populationen separiert. Ein Teil wanderte vermutlich über das ungarische Gebiet weiter über die heutige Schweiz in den südwestlichen Teil Deutschlands ein. Somit konnte BAKO & JABLONOWSKI (1926) zitiert in: ZWÖLFER (1928a) in Ungarn und ZWÖLFER (1928a) in Deutschland große Schäden im Mais beobachten, die sie mit einer Änderung der Nährpflanzenpräferenz begründeten. Demgegenüber versuchte ANDERSEN (1943) vergebens *O. nubilalis* in der Hallertau (Bayern) durch den Maisanbau vom Hopfen fernzuhalten. Daraus schlussfolgerte LANGENBRUCH (1985), dass es sich bei den Zünslern von ANDERSEN um die E-Rasse, bei denen von ZWÖLFER jedoch um die Z-Rasse gehandelt haben muss. Eine weitere Population könnte dann weiter nördlich über die südwestlichen Bezirke Polens (nach KANIA (1968) traten erste Schäden Mitte der 50er Jahre auf) nach Österreich ins untere Inntal in Richtung Pocking (LANGENBRUCH et al., 2000) eingewandert sein. Dies deckt sich mit den RAPD-Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit, die eine enge genetische Ähnlichkeit der Standorte Pocking und Polen aufzeigten. Weiterhin bestätigten die RAPD- und TGGE-Ergebnisse eine starke Separation der südlichen Standorte aus Baden-Württemberg gegenüber denen aus Bayern und allen nördlich gelegenen Standorten. Von den südlichen Gebieten Deutschlands begann dann die weitere Ausbreitung entlang der Flussebenen in Richtung Norden bei einer vorherrschenden westlichen Hauptwindrichtung (Abb. 56). Aufgrund der bei den RAPD-Ergebnissen ermittelten Stellung des Standortes Pocking zwischen den westdeutschen und den nordostdeutschen Populationen, könnte von einer gemeinsamen Ausbreitung ausgegangen werden. Somit kann die höchste genetische Ähnlichkeit zwischen Oderbruch und Halle mit der zeitlich jüngsten Trennung erklärt werden. Hingegen wird bei den Populationen Hessisches Ried und Niedernberg schon eine

geringere Ähnlichkeit sichtbar. Die geringste Ähnlichkeit innerhalb einer Metapopulation wurde bei der südwestdeutschen Metapopulation (Karlsruhe, Bodensee, Freiburg) ermittelt. Ausgehend von den Maisschäden Anfang des 20. Jahrhunderts (ZWÖLFER, 1928b) wanderte *O. nubilalis* vermutlich vor ca. 100 Jahren zunächst in den südwestlichen Teil Deutschlands ein. Aufgrund der Ähnlichkeit innerhalb der südwestdeutschen Gruppe könnte diese Vermutung damit bestätigt werden. Warum jedoch Bodensee und Karlsruhe eine höhere genetische Ähnlichkeit besaßen als zur Population Freiburg, obwohl Bodensee erst nach Freiburg und Karlsruhe befallen wurde (ZWÖLFER, 1928a), kann nicht erklärt werden. Es kann nur vermutet werden, dass besondere zur Migration geeignete Genotypen ausgehend von Freiburg nach Karlsruhe und Bodensee vorgedrungen sind.

Erst durch den zunehmenden Maisanbau ab den 60er Jahren von 100 000 ha auf bis zu 800 000 ha im Jahr 1980 (ANONYMUS, 2003b) konnte *O. nubilalis* ihre Populationsdichten erhöhen und damit ein massenhaftes Auftreten ermöglichen. Der Mais, mit seinem weichen, dicken Stängel und hohen Kohlenhydratgehalt, gab *O. nubilalis* ausreichende Nährstoffe für eine schnelle Entwicklung und eine starke Reproduktionsrate gegenüber anderen Kulturpflanzen mit geringem Stängeldurchmesser (LOSEY, 2002). Da das erste Auftreten von *O. nubilalis* an den Standorten Pocking (Anfang 80er Jahre - pers. Mitt. LANGENBRUCH, 2003) und Oderbruch (1985 - POPKO, 1988) zeitgleich in den 80er-Jahren erfolgte, kann eine „unauffällige“ Ausbreitung innerhalb weniger Jahre angenommen werden.

4.4 Auswirkungen populationsgenetischer Kenntnisse auf das Insektenresistenzmanagement beim Anbau von *Bt*-Mais

Durch einen großflächigen Anbau von *Bt*-Mais besteht eine große Gefahr, dass *O. nubilalis* eine Resistenz gegen das *Bt*-Toxin entwickelt, da ständig ein starker Selektionsdruck auf ihn ausgeübt wird. Das gezielte Suchen nach resistenten Maiszünlern im konventionellen Feld könnte durch den Einsatz von resistenzspezifischen Primern schneller und effektiver durchgeführt werden als mit dem aufwendigen F2-Screening. Um die Entstehung einer Resistenz rechtzeitig zu erkennen, wäre es wichtig, Resistenzmarker bereits vor dem großflächigen Anbau von *Bt*-Mais in Deutschland zu erhalten. Es hat sich jedoch gezeigt, dass beim gegenwärtig geringen Anbau von *Bt*-Mais noch keine resistenten Tiere identifiziert werden konnten (pers. Mitt. HOMMEL, 2003). Auch beim intensiven Anbau von Mais und Baumwolle in Amerika wurden keine resistenten Ziel-Organismen identifiziert (FOX, 2003). Erst mit einem umfangreichen Anbau von *Bt*-Mais ist die

wichtige Voraussetzung erfüllt, um auf der Grundlage überlebender Tiere das F2-Screening nach ANDOW & ALSTAD (1998) zu realisieren. Ein Problem dabei ist, dass im Feld mit *Bt*-Mais auch anfällige Pflanzen stehen. Damit muss auch über den Nachweis des *Bt*-Toxins eine weitere Eingrenzung der gesammelten überlebenden Larven erfolgen. Die DNA der resistenten F2-Laborpopulation kann anschließend über eine RAPD-PCR mit der DNA der empfindlichen Tiere aus dieser Status-quo-Analyse verglichen werden. Dabei sollten die RAPD-Muster von allen drei Jahren herangezogen werden, da zwischen verschiedenen Jahren innerhalb einer Lokalpopulation eine sichtbare genetische Variabilität bestand. Wenn eine resistente Laborpopulation eine zusätzliche Bande amplifiziert, die in keinem RAPD-Muster über die drei Jahre auftrat, dann wird diese Bande zunächst sequenziert. Anschließend werden anhand der sequenzierten Daten spezifische Primer entwickelt, die als SCAR- (*sequence characterized amplified region*) oder als Marker korreliert mit der Resistenz auftreten und nach einer Validierung in der Praxis für das Resistenzmanagement herangezogen werden können. Allerdings ist es möglich, dass ein Screening auf resistente Banden mittels RAPD-PCR mit den in dieser Arbeit verwendeten 20 Primern nicht ausreichend ist. In anderen Arbeiten lieferten von einer großen Auswahl an Primern nur wenige Primer resistente Markerbanden (MICHELMORE et al., 1991 – 3 von 100 Primern; MARTIN et al., 1991 – 3 von 144 Primer; PARAN et al., 1991 – 4 Marker verbunden mit 2 Resistenzgenen, 6 Marker mit einem Resistenzgen von 212 Primern). Für eine rechtzeitige Erkennung der Resistenzentstehung müssten dann mit spezifischen Primern jährlich 20er-Populationen vom Feld gesammelt werden, um das Auftreten (qualitativ) und die Intensität (quantitativ) der diagnostischen Bande zu ermitteln. Bei mehreren 20er-Gruppen pro Jahr kann die Frequenz dieser diagnostischen Bande berechnet werden. Bei einer Frequenzerhöhung könnte dann ein vorübergehender Anbaustop für *Bt*-Mais vorgenommen werden, da nach HUANG et al. (1999) bei Abwesenheit des Selektionsdrucks wahrscheinlich eine Bevorzugung von Genen für Nicht-Resistenz besteht. Allerdings konnten EDWARDS & HOY (1995) bei ausgesetzten Blattlausparasiten *Trioxys pallidus* mit Insektizidresistenz keine Frequenzerhöhung bei sechs RAPD-Markerbanden in der Feldpopulation nach drei Jahren feststellen. Die Nutzung von RAPD-Mustern für die Entwicklung diagnostischer Marker wurde insbesondere im Zusammenhang mit Pflanzenkrankheiten gezeigt. Dass eine schnelle Identifizierung resistenter Genotypen bei bereits bekannten Resistenzgenen durch Markerbanden mit Hilfe der RAPD-PCR möglich ist, zeigen die folgenden Arbeiten: MARTIN et al. (1991) wiesen damit *Pseudomonas* Resistenz-Gene in Tomaten nach,

MICHELMORE et al. (1991) und PARAN et al. (1991) identifizierten Mehltau-Resistenz-Gene bei Salat und NOTHNAGEL & STRAKA (2004) wiesen Resistenz-Gene gegen den pilzlichen Krankheitserreger *Alternaria dauci* bei der Möhre nach.

Um einer Resistenzentstehung entgegenzuwirken, kann sowohl eine hohe Migration zwischen den lokalen Populationen als auch die Anlage von Refugien mit konventionellem Mais oder Wildpflanzen eine „Ausdünnung“ der homozygot resistenten Gene bewirken. Da durch die RAPD-PCR eine hohe genetische Variabilität innerhalb einer Lokalpopulation und ein geringer Genfluss zwischen den Lokalpopulationen von *O. nubilalis* ermittelt wurden, wäre ohne Refugien eine schnelle **Resistenzentstehung** (KRONBERG, 1993) aber eine langsame **Resistenzausbreitung** zu erwarten. BLATTER & WOLFE (1996) gehen bei einer Anlage von Refugien von einer geringen Gefahr einer Resistenzbildung aus. Ein Refugium mit konventionellem Mais kann jedoch eine stärkere Separation durch den geringen Genfluss innerhalb einer Lokalpopulation bewirken und somit die Entstehung einer Resistenz in einer „Teilpopulation“ fördern. Dadurch wird die große Variabilität vermindert, höhere F_{ST} -Werte erreicht und es werden RAPD-Muster entstehen, die mit den in dieser Arbeit ermittelten RAPD-Mustern wenig vergleichbar sind. Das ostdeutsche Befallsgebiet, besonders im Oderbruch, ist aufgrund der großen zusammenhängenden Anbauflächen und des starken Befalls (hohe Individuendichten) besonders für eine schnelle Entwicklung der *Bt*-Resistenz prädestiniert. BLATTER & WOLFE (1996) schätzen für die Schweiz eine geringe Resistenzbildung, da dort die Mais-Anbauflächen klein sind und damit nur ein geringer Selektionsdruck besteht. Wenn sich jedoch eine Resistenz in einer Population etabliert, dann kann anhand der ermittelten genetischen Ähnlichkeiten eine Abschätzung der Ausbreitungsrichtung in andere Lokalpopulationen und durch die F_{ST} -Werte die Geschwindigkeit der Ausbreitung zu anderen Lokalpopulationen vorgenommen werden. Das Oderbruch ist aufgrund der Befallssituation und den nur geringen Möglichkeiten zum Pflügen nach der Maisernte für den Anbau von *Bt*-Mais besonders prädestiniert. Die Ausbreitung resistenter Tiere in andere norddeutsche Lokalpopulationen wäre allerdings durch die während des Falterfluges vorherrschende (nord)westliche Windrichtung erschwert. Eine Drift von Resistenzgenen zwischen älteren etablierten Befallsgebieten, wie der südwestdeutschen Metapopulation, wird als weniger kritisch betrachtet, da ihre Populationsdichten und somit auch ihr Genfluss bedeutend geringer sind. Die Entstehung neuer Befallsgebiete als Folge der Migration aus resistenten Lokalpopulationen muss dann auf resistente Tiere zurückgeführt werden. Ein Anbau von *Bt*-Mais wäre dann keine Bekämpfungsoption.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erfassung der genetischen Variabilität zwischen Populationen des Maiszünslers *Ostrinia nubilalis* und die Gruppierung von genetisch homogenen Populationen. Darauf aufbauend sollten Aussagen zur Migration zwischen *O. nubilalis*-Populationen in Deutschland und zur künftigen Ausbreitung von möglichen *Bt*-resistenten Maiszünslern als Folge des Anbaus von *Bt*-Mais abgeleitet werden. Für die Beantwortung dieser Fragen wurde die *O. nubilalis*-DNA mit den molekularbiologischen Methoden RAPD-PCR, ITS-RFLP, TGGE und der Sequenzierung untersucht. Die RAPD-Untersuchungen von 1999 – 2001 zeigten den genetischen *Status-quo* von *O. nubilalis*-Populationen in den wichtigsten Befallsgebieten Deutschlands noch vor dem Anbau von *Bt*-Mais.

In den methodischen Untersuchungen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Die Poolung von 20 L5-Larven in einem gemeinsamen DNA-Extrakt repräsentiert die Population hinreichend. Obwohl Geschwisterlarven vom Feld das RAPD-Muster der Population kaum beeinflussen, sollte eine repräsentative Populations-Gruppe von verschiedenen Feldbereichen und Stängeln gesammelt werden. Laborzuchten ab zwei bis drei Generationen sind aufgrund der zunehmenden Homogenität der RAPD-Muster ungeeignet als Repräsentanz ihrer Herkunft.
- Die RAPD-Muster werden durch assoziierte Mikroben-DNA in der *O. nubilalis*-DNA von L5-Larven nicht beeinflusst. Eine Entfernung des Darmes der L5-Larven vor der DNA-Extraktion ist daher nicht notwendig.
- Larven der E-Rasse verändern das RAPD-Muster in der Populationsprobe der Z-Rasse deutlich. Bei der Probenentnahme der L5-Larven der Z-Rasse von einem Maisfeld sollte daher durch einen genügenden Abstand zum Feldrand (Breite des Vorgewendes) das Sammeln von Larven der E-Rasse ausgeschlossen werden.

Aus den populationsgenetischen Untersuchungen können folgende Aussagen getroffen werden:

- Innerhalb der Lokalpopulationen wurde eine hohe genetische Variabilität der Individuen nachgewiesen, was auf hohe Mutationsraten schließen lässt. Diese intrapopulationsspezifische Variabilität ist jedoch im Vergleich zur

interpopulationsspezifischen Variabilität geringer. Das weist darauf hin, dass ein geringer Genfluss zwischen den Populationen besteht. Dieser wird durch die großen Distanzen von 100 – 200 km, topographische Barrieren, geringe Flugaktivitäten von *O. nubilalis* und durch einen geringen Maisanbau zwischen den Standorten verursacht.

- Ein Zusammenhang zwischen der genetischen Variabilität aller Lokalpopulationen und ihren geographischen Distanzen, Höhen in NN, Niederschlägen und Temperaturen wurde nicht festgestellt. Die nicht vorhandene Korrelation zwischen genetischer und geographischer Variabilität könnte darauf hinweisen, dass sich die Lokalpopulationen erst vor kurzer Zeit (< 100 Jahre) getrennt haben und damit die Standortcharakteristik sich in den Distanzen noch nicht aufzeigen lässt.
- Aufgrund der großen genetischen Variabilität innerhalb einer Lokalpopulation sollten die Voraussetzungen für eine schnelle Resistenzentwicklung gegeben sein. Durch den geringen Genfluss zwischen den Lokalpopulationen ist die Ausbreitung der Resistenz in eine benachbarte anfällige Population eher gering einzustufen. Wenn jedoch der Maisanbau, insbesondere von Körnermais, regional zunimmt und somit die Kolonisation der *island*-Habitats zwischen den *mainland*-Habitats ansteigt, dann wird auch die Abundanz von *O. nubilalis* zunehmen, die die Resistenzausbreitung beschleunigen würde.
- Aufgrund der großen genetischen Variabilität innerhalb einer Lokalpopulation ist das Auffinden resistenzbezogener DNA-Marker nur über die Status-quo-Analyse von drei Jahren möglich. Anhand der Dendrogramme kann eine Abschätzung der Resistenzausbreitung vorgenommen werden. Aufgrund der ermittelten F_{ST} -Werte ist eine geringe Ausbreitungsgeschwindigkeit der Resistenz zwischen zwei Lokalpopulationen zu erwarten.
- Auf der Basis der genetischen und geographischen Ergebnisse werden vier Metapopulationen definiert: 1.) nordostdeutsche Metapopulation mit Oderbruch und Halle 2.) westdeutsche Metapopulation mit Hessischem Ried, Niedernberg und Bonn 3.) südwestdeutsche Metapopulation mit Karlsruhe, Freiburg und Bodensee 4.) südostdeutsche Metapopulation mit Pocking. Die norddeutsche Metapopulation bildet zur westdeutschen Metapopulation die höchste genetische Ähnlichkeit. Die südostdeutsche Metapopulation nimmt genetisch

eine Zwischenstellung zwischen der nordost- und westdeutschen Metapopulation ein. Die südwestdeutsche Metapopulation separiert sich in den RAPD-Mustern von allen anderen Metapopulationen. Diese Separierung wurde auch bei der Untersuchung von ITS-1-Fragmenten durch die TGGE bestätigt.

- Anhand der RAPD-PCR, TGGE und Sequenzierung konnte eine klare Trennung der Z-Rasse von der E-Rasse vorgenommen werden. Die TGGE zeigte bei der Z-Rasse eine zusätzliche Variante des ITS-1-Typs gegenüber der E-Rasse. Bei der Sequenzierung aller Varianten des ITS-1-Typs wurden zwei Sequenzunterschiede detektiert, bei denen es sich um eine Deletion bzw. Substitution jeweils eines Nukleotids bei der E-Rasse gegenüber der Z-Rasse handelte. Die Rassen haben sich wahrscheinlich vor über 60 000 Jahren getrennt und sich von Asien nach Europa ausgebreitet. Dabei wurde Europa sehr viel früher von der E-Rasse besiedelt, bevor die Z-Rasse zu Beginn des 20. Jahrhunderts in Deutschland einwanderte. Wie die RAPD-PCR und die TGGE zeigten, müssen zwei unabhängige Einwanderungen der Z-Rasse nach Deutschland stattgefunden haben. Eine erfolgte um 1900 in den südwestlichen Teil Deutschlands (Baden-Württemberg) und eine weitere ab den 50er Jahren in den südöstlichen Teil Deutschlands (Bayern). Von dort aus breitete sich *O. nubilalis* in wenigen Jahrzehnten „unauffällig“ in Richtung Norden aus. Durch den immer stärkeren Maisanbau, der zunehmend andere Kulturen wie Futterpflanzen, Futterrüben und Kartoffeln verdrängte, konnten *O. nubilalis* ihre Populationsdichte an dem für sie vorteilhaften Mais erhöhen und damit in unterschiedlichen Regionen Deutschlands zeitgleich in den 80er Jahren bemerkt werden. Die Ausbreitung in die westlichen Gebiete, z. B. in die Region um Bonn, vollzog sich langsamer als in den nordöstlichen Regionen. Die schnellere Ausbreitung in der nordöstlichen Region hat vor allem drei Gründe: die westliche Hauptwindrichtung während des Falterfluges, der zunehmende Anteil des pfluglosen Maisanbaues und ein höherer Anteil an Körnermais.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- ABDULLAHI, I., WINTER, S., ATIRI, GI., THOTTAPPILLY, G. (2003): Molecular characterisation of whitefly, *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) population infesting cassava. *B. Ent. Res.* **93**: 97-106.
- ADAMS, R.P., DEMEKE, T., ABULFATIH, H.A. (1993): RAPD DNA fingerprints and terpenoids: clues to past migration of *Juniperus* in Arabia and east Africa. *Theor. A. Gen.* **87**: 22-26.
- ALTHOFF, D.M., THOMPSON, J.N. (2001): Geographic structure in the searching behaviour of a specialist parasitoid: combining molecular and behavioural approaches. *J. Evol. Biol.* **14**: 406-417.
- ALTSCHUL, S.R., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG J., ZHANG, J., MILLER, W., LIPMANN, D.J: (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acid. R., Heft* **25**: 3389-3402.
- ALVAREZ, J.M., HOY, M.A. (2003): Molecular Markers in Classical Biological Control of the Citrus Leafminer: Taxonomic and Ecological Evaluations. *Proceedings of USDA Forest Service FHTET*: 75-89.
- ANDALORO, J.T., ECKENRODE, C.J. ROBBINS, P.S., MUKA, A.A., ROSE, K.B., WILLSON, H., BECKER, R. (1982): Biology and identification of the European Corn Borer *Ostrinia nubilalis* (Hübner). In: *European Corn Borer Identification, Monitoring, Flight Patterns and Control Special Report*, Nr. 45: 2-8.
- ANDERSEN, K. (1943): Der Maiszünsler (*Pyrausta nubilalis* Hübner.) als Hopfenschädling. *Anz. Schädlingsk. Pflanzensch. Umweltsch.* **20**: 227 – 229.
- ANDOW, D.A., HUTCHISON, W. D. (1998): *Bt*-Corn Resistance Management. In: MELLON, M., RISSLER, J. (Hrsg.): *Now or Never – Serious new Plan to Safe a Natural Pest Control*. Union of Concerned Scientists (UCS): 19-66.
- ANDROW, D.A., ALSTAD, D.N. (1998): F2-Screen for Rare Resistance Alleles. *J. Econ. Ent.* **91**: 572-578.
- ANONYMUS (1988): *Biologischer Pflanzenschutz individuelle Behandlung aller wichtigen Arten*. Pietsch Verlag, Stuttgart: 1-200.
- ANONYMUS (1994): *Lexikon der Biologie*. 7. Bd., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford: 1-476.
- ANONYMUS (1998a): AMW NÜTZLINGE GMBH, *Die TrichoKarte Mais zur biologischen Bekämpfung des Maiszünslers*.
- ANONYMUS (1998b): *The Environmental Protection Agency's White Paper on Bt Plant-pesticide Resistance Management* January, US EPA (Hrsg.), **14**: 1-76.
- ANONYMUS (1999): *An Evaluation of Insect Resistance Management in Bt field corn – A Science based framework for Risk Assessment and Risk Management*. ILSI-International Life Sciences Institute (Hrsg.): 1-78.
- ANONYMUS (2001a): AGBIOS INC, *Principles and Practice of Novel Food Safety Assessment*. PartNo.AGBNFSAM-01-099A, Agriculture and Biotechnology Strategies (Canada) Inc. (Hrsg.): 69-75.
- ANONYMUS (2001b): *AmpliTaq® DNA Polymerase, Stoffelfragment*. Beipackzettel von Perkin Elmer.
- ANONYMUS (2002a): *Statistisches Jahrbuch 2002 für die Bundesrepublik Deutschland*. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, Verlag Metzler-Poeschel, Stuttgart: 1-714.
- ANONYMUS (2002b): *BBA Pflanzenschutzmittelverzeichnis Teil 1 Ackerbau – Wiesen und Weiden Hopfenbau – Nichtkulturland*. Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Braunschweig (Hrsg.), Saphir Verlag, Ribbesbüttel, 50. Auflage, 1-364.
- ANONYMUS (2002c): *Beschreibende Sortenliste Getreide, Mais, Ölfrüchte, Leguminosen*,

- Hackfrüchte. Bundessortenamt (Hrsg.), Deutscher Landwirtschaftsverlag GmbH: 1-260.
- ANONYMUS (2002d): AGBIOS INC, Essential Biosafety – A comprehensive Source of scientific and regulatory information. <<http://www.essentialbiosafety.info>>
- ANONYMUS (2003a): Mycotoxins: Risks in Plant, Animal and Human Systems. Council for Agricultural Science and Technology (Hrsg.), Ames, Iowa, USA, Nr. 139:1217.
- ANONYMUS (2003b): Deutsches Maiskomitee <<http://www.maiskomitee.de>>
- ATTIA, B.M. (1985): Ökologische Beziehungen zwischen Maisblattläusen, polyphagen Prädatoren und dem Maiszünsler *Ostrinia nubilalis* Hbn. Univ. Hohenheim, Fakultät III Agrarwissenschaften I (Pflanzenproduktion und Landschaftsökologie) Dissertation.
- AVANISS-AGHAJANI, E., DAVID, K.J., BRUNK, C.C. (1994): A Molecular Technique for Identification of Bacteria Using Small Subunit Ribosomal RNA Sequences. *Biotechniqu.* **17**: 144-149.
- BACKHAUS, H. (1995): Approaches to fingerprinting of microbial communities by separating ribosomal sequences with temperature gradient electrophoresis. In: EU Workshop on the Application of DGGE and TGGE in Microbial Ecology, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig, Germany.
- BAGUETTE, M., PETIT, S., QUÉVA, F. (2000): Population spatial structure and migration of three butterfly species within the same habitat network: consequences for conservation. *J. Appl. Ecol.* **37**: 100-108.
- BALLINGER-CRABTREE, M.E., BLACK, W.C., MILLER, B.R. (1992): Use of Genetic Polymorphism detected by the Random-Amplified Polymorphic DNA Polymerase chain Reaktion for Differentiation and Identification of *Aedes Aegypti* Subspecies and Populations. *Am. J. Trop. M.* **47**: 893-901.
- BARAC, T., TAGHAVI, S., BORREMANS, B., PROVOOST, A., OEYEN, L., COLPAERT, J. V., VANGRONSVELD, J., VAN DER LILIE, D. (2004): Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nat. Biotech.* **22**: 583-588.
- BARNAY, O., HOMMAY, G., GERTZ, C., KIENLEN, J.C., SCHUBERT, G., MARRO, J.P., PIZZOL, J., CHAVIGNY, P. (2001): Survey of natural populations of *Trichogramma* (Hym., Trichogrammatidae) in the vineyards of Alsace (France). *J. Appl. Ent.* **125**: 469.
- BASSAM, B.J., CAETANO-ANOLLES, G., GRESSHOFF, P.M. (1992): DNA amplification fingerprinting of bacteria. *Appl. Micr. B.* **38**: 70-76.
- BAUCUS, M., KALB, M. (1982): Klimadaten von Europa Teil III: Südost- und Osteuropa. DWD Deutscher Wetterdienst, Selbstverlag des Deutschen Wetterdienstes, Offenbach am Main, A 15.
- BAUMANN, R., SCHUBERT, R., HEITLAND, W., AUGER-ROZENBERG, M.-A., FAIVRE-RIMPANT, P., MÜLLER-STARCK, G. (2003): Genetic diversity within and among populations of *Diprion pini* (Hym., Diprionidae) determined by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction of haploid males. *J. Appl. Ent.* **127**: 258-264.
- BAYAR, K., TÖRJÉK, O., KISS, E., GYULAI, G., HESZKY, L. (2001): Genetic variation within and among populations of *Aeolothrips intermedius*. Proceedings of the 7th International Symposium on Thysanoptera, Univ. Region Calabria, Italien, 2. bis 7. Juli 2001: 369-372.
- BECKENBACH, A. T., WEI, Y.W., LIU, H. (1993): Relationship in the *Drosophila obscura* species group, inferred from mitochondrial cytochrome oxidase II sequences. *Mol. Biol.* **10**: 619-634.
- BEGON, M., HARPER, J.L., TOWNSEND, C.R. (1991): Ökologie Individuen, Populationen

- und Lebensgemeinschaften. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin: 1-1024.
- BIGNELL, D.E. (1984): The arthropod gut as an environment for microorganismus. In: Invertebrate-Microbial Interactions, ANDERSON, J.M., RAYNER, A.D.M., WALTON, D.W. (Hrsg.), Cambridge University Press: 205-228.
- BLACK, W. C. (1993): PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insec. Mol. B.* **2**:1-6.
- BLACK, W.C., DU TEAU, N.M., PUTERKA, G.J., NECHOLS, J.R., PETTORINI, J.M. (1992): Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). *B. Ent. Res.* **82**: 151-159.
- BLATTER, R., WOLFE, M. S. (1996): Die Verwendung molekularbiologischer Technologien zur Erzeugung von Wirtsresistenz gegen Schaderreger - Mögliche Folgen einer Anpassung der Krankheiten und Schädling. In: Gentechnisch veränderte krankheits- und schädlingsresistente Nutzpflanzen. SCHULTE, E., KÄPPELI, O. (Hrsg.), Fachstelle für Biosicherheitsforschung und Abschätzung von Technikfolgen des Schwerpunktprogramms Biotechnologie des Schweizerischen Nationsfonds (BATS), Basel, Bd. 1: 631.
- BOLIN, P.C., HUTCHISON, W.D., ANDOW, D.A. (1999): Long-term selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry 1Ac endotoxin in a Minnesota population of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae), *J. Econ. Entomol.* **92**: 1021-1030.
- BÖTTGER, E.C. (1990): Frequent contamination of Taq polymerase with DNA. *Clin. Chem.* **36**: 1258.
- BOWDITCH, B.M., ALBRIGHT, D.G., WILLIAMS, J.G.K., BRAUN, M.J. (1993): Use of Randomly Amplified Polymorphic DNA Marker in Comparative Genome Studies. *Meth. Enzym.* **224**: 294–309.
- BRINDLEY, T.A., DICKE, F.F. (1963): Significant Developments in European Corn Borer Research. *Ann. R. Entom.* **8**: 155–176.
- BRUDFORD, M.W., CIOFI, C., FUNK, S.M. (1998): Characteristics of microsatellites. In: Molecular Tools for Screening Biodiversity. KARP, A., ISAAC, P.G. AND INGRAM, D.S. (Hrsg.), Chapman & Hall, London: 202-205.
- BUCKLER, E.S., HOLTSFORD, T.P. (1996): *Zea* Ribosomal Repeat Evolution and Substitution Patterns. *Mol. Biol.* **13**: 623-632.
- BURGSTALLER, H. (1974): Untersuchungen über den Einfluss endogener und exogener Faktoren auf die Anfälligkeit von Maisgenotypen gegenüber dem Maiszünsler *Ostrinia nubilalis* Hb. Univ. Hohenheim, Abteilung für Angewandte Entomologie, Fachbereich Agrarbiologie, Dissertation.
- BURTH, U., FREIER, B., HURLE, K., RESCHKE, M., SCHILLER, R., STEIN, B., WESTPHAL, D. (2002): Die Grundsätze des integrierten Pflanzenschutzes. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **54**: 208-211.
- BÜSCHER, N., ZYPRIAN, E. (1994): Sortencharakterisierung durch PCR-Methoden am Beispiel der Weinrebe (*Vitis spec*) In: PCR im medizinischen und biologischen Labor – Handbuch für den Praktiker. WINK, M., WEHRLE, H. (Hrsg.), Git Verlag GmbH, Darmstadt: 190 – 199.
- CAETANO-ANOLLES, G., BASSAM, B.J., GRESSHOFF, P.M. (1991): DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechniqu.* **9**: 553-556.
- CARLSON J.E., TULSIERAM, L.K., GLAUBITZ, LUK, V.W.K., KAUFFELDT, C., RUTLEDGE, R. (1991): Segregation of random amplified DNA markers in F1 progeny of conifers. *Theor. A. Gen.* **83**: 194-200.
- CARPENTER, J., FELSOT, A., GOODE, T., HAMMING, M., ONSTAD, D., SANKULA, S. (2002): Comparative Environmental Impacts of Biotechnology-derived and Traditional

- Soybean, Corn, and Cotton Crops. Council for Agricultural Science and Technology (Hrsg.), Ames, Iowa, USA: 1-198.
- CERVANTES, T.C., BAUMGARTE, S., DOHRMANN, B., TRESCHER, K., TEBBE, C.C. (2002): Auswirkungen von Salzstress auf die Vielfalt von Bakteriengesellschaften in den Rhizosphären von Mais. Jahresbericht der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL): 38.
- CERVERA, M.T., CABEZAS, J.A., SIMÓN, B., MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M., BEITIA, F., CENIS, J.L. (2000): Genetic relationships among biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on AFLP analysis. B. Ent. Res. **90**: 391-396.
- CHAPCO, W. ASHTON, N.W., MARTEL, R.K.B., ANTONISHYN, N. (1992): A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of grasshoppers. Genome **35**: 569-574.
- CHELIUS, M.K., TRIPLETT, E.W. (2001): The Diversity of Archaea and Bacteria in Association with the Roots of *Zea mays* L. Microb. Ecol. **41**: 252-263.
- CHERRY, T., SZALANSKI, A.T, TODD, T.C., POWERS, T.O. (1997): The internal transcribed spacer region of *Belonolaimus* (Nemata: Belonolaimidae). J. Nematol. **29**: 23-29.
- CLARK, A.G., LANIGAN, M.S. (1993): Prospect for Estimating Nucleotide Divergence with RAPDs. Mol. Biol. **10**: 1096-1111.
- CLARK, T.L., MEINKE, L.J., FOSTER, J.E. (2001): Molecular phylogeny of *Diabrotica* beetles (Coleoptera: Chrysomelidae) inferred from analysis of combined mitochondrial and nuclear DNA sequences. Insec. Mol. B. **10**: 303-314.
- COATES, B.S., HELLMICH, R.L., LEWIS, L.C. (2001): Direct Submission. Submitted Corn Insects & Crop Genetics, USDA-ARS, 11 Genetics Lab, Ames, IA 50011.
- COBB, B.D., CLARKSON, J.M. (1994): A simple procedure for optimising the polymerase chain reaction (PCR) using modified Taguchi methods. Nucl. Acid. R. **22**: 3801-3805.
- CONRADI, M. (2000): Schritte auf dem Weg zu einer ökologisch differenzierten, artzentrierten GIS-Analyse. <http://www.agit.at/papers/2000/GGTSPU-styx.bba.de-14000-1990312-DAT/conradi_FP_10.pdf>
- CRAMER, H. H. (1967): Pflanzenschutz und Welternte. Bayer Pflanzenschutznachrichten: 1-523.
- CRAVANZOLA, F., PIATTI, P., BRIDGE, P.D., OZINO, O.I. (1997): Detection of genetic polymorphism by RAPD-PCR in strains of the entomopathogenic fungus *Beauveria brongniartii* isolated from the European cockchafer (*Melolontha* spp.). Letters in Appl. Micr. B. **25**: 289-294.
- CRICKMORE, N. (2002): *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. <http://www.biols.susx.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/list.html>
- CZARNETZKI, A.B., THIMM, T., TEBBE, C.C. (2003): Bedeutung von Collembolen als Habitat für Mikroorganismen. Jahresbericht der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL): 35.
- CZIHAK, G. (1992): Evolution. In: Biologie. CZIHAK, G., LANGER, H., ZIEGLER, H. (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, 5. Auflage: 855-939.
- DÄNICKE, S., VALENTA, H. (1999): Mykotoxine im Futter – Gefahr für landwirtschaftliche Nutztiere? Forschungsreport, Heft **20**: 210-213.
- DE BARRO, P.J., DRIVER, F. (1997): Use of RAPD PCR to Distinguish the B Biotype from Other Biotypes of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). Aust. J. Ent. **36**: 149-152.
- DEICHSEL, G., TRAMPISCH, H.J. (1985): Clusteranalyse und Diskriminanzanalyse. Fischer Verlag, Stuttgart, New York: 1-135.
- DELLAPORTA, S.L., WOOD, J., HICKS, L.B. (1983): A plant miniprep. Version II.

- Pl. Mol. B. Re. **1**: 19-21.
- DEN BOER, P.J. (1998): The role of density-independent processes in the stabilization of insect populations. In: Insect Populations in theory and in practice. DEMPSTER, J.P., MCLEAN, I.F.G. (Hrsg.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London: 53-80.
- DERAGON, J.M., LANDRY, B.S. (1992): RAPD and other PCR-based analyses of plant genomes using DNA extracted from small leaf disks. PCR Methods Applic. **1**: 175-180.
- DESALLE, R.T., FREEDMAN, PRAGER, E.M., WILSON, A.C. (1987): Tempo and mode of sequence evolution in mitochondrial DNA of Hawaiian *Drosophila*. J. Mol. Evol. **26**: 157-164.
- DEVOS, K.M., GALE, M.D. (1992): The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. Theor. A. Gen. **84**: 567-572.
- DICE, L.R. (1945): Measures of the amount of ecological association between species. Ecology **26**: 295-302.
- DOWDY, A.K., MCGAUGHEY, W.H. (1996): Using random amplified polymorphic DNA to differentiate strains of the indianmeal moth (Lepidoptera. Pyralidae). Env. Entomol. **25**: 396-400.
- DOWNIE, D.A. (2000): Patterns of genetic variation in native grape phylloxera on two sympatric host species. Mol. Ecol. **9**: 505-514.
- DUBACH, J.M., RICHMAN, D.B., TURNER, R.B. (1988): Genetic and Morphological Variation among Geographical Populations of the Range Caterpillar, *Hemileuca oliviae* (Lepidoptera, Saturniidae). Ann. Ent. S. A. **81**: 132-137.
- DUNBAR, J., TICKNOR, L., KUSKE, C.R. (2001): Phylogenetic Specificity and Reproducibility and New Method for Analysis of Terminal Restriction Fragment Profiles of 16S rRNA Genes from Bacterial Communities. Appl. Envir. **67**: 190-197.
- EDWARD, O.R., HOY, M.A. (1995): Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers To Monitor Laboratory-Selected, Pesticide-Resistant *Trioxys pallidus* (Hymenoptera: Aphidiidae) after Release into Three California Walnut Orchards. Ann. Ent. S. A. **24**: 487-496.
- EFRON, B. (1979): Bootstrapping method: Another look at the jackknife. Ann. Statist. **7**: 1-26.
- EFRON, B. (1982): The jackknife, the bootstrap, and other resampling plans. Conf. Board Math. Sci. Soc. Ind. **38**: 1-92.
- EFRON, B. (1987): Better bootstrap confidence intervals. J. Am. Stat. A. **8**: 2171-2185.
- ELLSWORTH, D.L., RITTENHLUSE, K.D., HONEYCUTT, R.L. (1993): Artifactual variation in random amplified polymorphic DNA banding patterns. Biotechniqu. **14**: 214-217.
- ENGELN, B., HEUER, H., FELSKE, A., NÜBERL U., BACKHAUS, H. (1995): Application of TGGE to investigate microbial soil communities. In: Workshop an Application of DGGE and TGGE in Microbial Ecology, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig, Germany.
- ETSCHIED, M., RIESNER, D. (1998): TGGE and DGGE. In: Molecular Tools for Screening Biodiversity. KARP, A., ISAAC, P.G. and INGRAM, D.S. (Hrsg.), Chapman & Hall, London: 135-141.
- FELKE, M., LANGENBRUCH, G. A. (2003): Wirkung von Bt-Maispollen auf Raupen des Tagpfauenauges im Laborversuch. Gesunde Pflanzen **55**: 1-7.
- FELKE, M., LANGENBRUCH, G.A. (2001): Gefährdet Bt-Pollen Schmetterlinge? Gesunde Pflanzen **53**: 24-28.
- FELKE, M., LANGENBRUCH, G.A. (2002): Gefährdet der Pollen von Bt-Mais unsere Schmetterlinge? – Untersuchungen an Erdeulenraupen (*Agrotis segetum*) und Tagpfauenauge (*Inachis io*). 53. Pflanzenschutztagung, Mitt. Biol. Bundesanst.

- Land- Forstwirtsch., Berlin Dahlem, Heft **390**: 324-325.
- FELSENSTEIN, J. (1985): Confidence limits on phylogenies. An approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- FLACKE, W. (1982): Ein Modell zur Phänotypischen Entwicklungssimulation von Maiszünslerpopulationen (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) im Freiland als Beitrag zur Arealsystemforschung. Philosophische Fakultät der Univ. des Saarlandes, Dissertation.
- FOX, J. L. (2003): Resistance to Bt toxin surprisingly absent from pests. *Nature Biotechnology* **21**: 958–959.
- FREDERICK, B.A., CAESAR, A.J. (2000): Analysis of Bacterial Communities Associated with Insect Biological Control using Molecular Techniques. In: Proceedings of the X. International Symposium on Biological Control of Weeds. NEAL R. SPENCER (Hrsg.): 261-267.
- FREIER, B., BURTH, U., KLINGAUF, F. (1999): Integrierter Pflanzenschutz als Leitbild – Die Anforderungen liegen über der derzeitigen Handlungsnorm der guten fachlichen Praxis. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **51**: 66-70.
- GALLUSSER, G., BOUZELBOUDJEN, M., RAHIER, M. (2002a): Modelling of the Distribution of *Oleria onega agarista* and *Oleria onega* ssp. (Lepidoptera, Ithomiinae), in Peru Using Geographic Information Systems and Geospatial Analysis. <http://www.unine.ch/biblio/bc/theses_pdf/these_gallusserS.pdf>
- GALLUSSER, S., GUADAGNUOLO, R., RAHIER, M. (2002b): Genetic (RAPD) diversity within and between *Oleria onega agarista* and *Oleria onega* ssp. (Ithomiinae, Nymphalidae, Lepidoptera) in north-eastern Peru. <http://www.unine.ch/biblio/bc/theses_pdf/these_gallusserS.pdf>
- GAWEL, N.J., BARTLETT, A.C. (1993): Characterisation of differences between whitflies using RAPD-PCR. *Insec. Mol. B.* **2**: 33-38.
- GERMAINE, K., KEOGH, E., GARCIA-CABELLOS, G., BORREMANS, B., VAN DER LELIE, D., BARAC, T., OEYEN, L., VANGRONSVELD, J., MOORE, F. P., MOORE, E. R.B., CAMPBELL, C. D., RYAN, D., DOWLING, D.N. (2004): Colonisation of poplar trees by *gfp* expressing bacterial endophytes. *FEMS Microb. Ecol.* **48**: 109-118.
- GOMES, N.C.M., HEUER, H., SCHÖNFELD, J., COSTA, R., MENDONCA-HAGLER, L., SMALLA, K. (2001): Bacterial diversity of the rhizosphere of maize (*Zea mays*) grown in tropical soil studied by temperature gradient electrophoresis. *Plant Soil.* **232**: 167-180.
- GOULD, F., ANDERSON, A., JONES, A., SUMERFORD, D., HECKEL, D.G., LOPEZ, J., MICINSKI, S., LEONARD, R., LASTER, M. (1997): Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *PNAS* **94**: 3519-3523.
- GOULD, F., TABASHNIK, B. (1998): Bt-Cotton Resistance Management. In: Now or Never – Serious new Plan to Safe a Natural Pest Control. Union of concerned Scientists (UCS), MELLON, M., RISLER, J. (Hrsg.):67-106.
- GRASER, E., WULF, A., BURGERMEISTER, W. (1995): Intraspecific variation of gypsy moth (*Lymantria dispar*) revealed by RAPD-PCR. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **47**: 25-27.
- GÜNTHER, K., HANNEMANN, H.-J., HIEKE, F., KÖNIGSMANN, E., SCHUMANN, H. (1994): Familie Pyralidae – Zünsler. In: *Urania Tierreich, Urania Verlag, Leipzig, Jena, Berlin, Bd. 6*: 677-682.
- HADRY, H., BALICK, M., SCHIERWATER, B. (1992): Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol. Ecol.* **1**: 55-63.
- HAN, Q., CAPRIO, M.A. (2002): Temporal and Spatial Patterns of Allelic Frequencies in Cotton Bollworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Env. Entomol.* **31**: 462-468.

- HANSKI, I. (1998): Metapopulation dynamics. *Nature* **396**: 41-49.
- HANSKI, I., GILPIN, M. (1991): Metapopulation dynamics: brief history and conceptual domain. *Biological Journal of the Linnean Society* **42**: 3-16.
- HARDWICK, S., ARMSTRONG, K.F., WRATTEN, S.D., PRESIDGE, R.A. (1997): Genetic Comparison of Whitefringed Weevil Species and Populations by RAPD-PCR. *Proceedings 50th N.Z. Plant Protection Conf.*: 327-332.
- HARTL, D.L., CLARK, A.G. (1997): *Principles of Population Genetics*. Third Edition. : 1-481.
- HAYMER, D. (1995): Genetic Analysis of Laboratory and Wild Strains of the Melon Fly (Dipera: Tephritidae) Using Random Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction. *Ann. Ent. S. A.* **88**: 705-710.
- HEDGES, S.B. (1992): The number of replications needed for accurate estimation of the bootstrap P value in phylogenetic studies. *Mol. Biol. Evol.* **14**: 35-38.
- HEGEMANN, B. (1997): Molekulargenetische Untersuchungen zur inter- und intraspezifischen Abgrenzung des Phytonematoden *Meloidogyne chitwoodi*. Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen, Diplomarbeit.
- HERING, O. (1997): Charakterisierung und Differenzierung bei *Fusarium* Link mittels RAPD und ITS-RFLP. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtschaft., Berlin Dahlem, Heft 331*: 1-133.
- HEUER, H., WIELAND, G., SCHÖNFELD, J., SCHÖNWALDER, A., GOMES, N.C.M., SMALLA, K. (2001): Bacterial Community Profiling Using DGGE or TGGE Analysis. In: *Environmental Molecular Microbiology: Protocols and Applications*. ROCHELLE, P.A. (HRSG.), Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.: 177-190.
- HILBECK, A., BAUMGARTNER, M., FRIED, P. M., BIGLER, F. (1998): Effects of transgenic *Bacillus thuringiensis* corn-fed prey on mortality and development time of immature *Chrysoperla carnea* (neuroptera: Chrysopidae), *Env. Entomol.* **27**: 480-487.
- HILLS, D., BULL, J. (1993): An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.* **42**: 182-192.
- HÖFTE, H., WHITELEY, H.R. (1989): Insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews* **53**: 242-255.
- HOMMEL, B., PACHOLSKY, D. (1996): Charakterisierung von Blattlaus- und Endosymbiontengenom von *Acyrosiphon pisum* mittels RAPD-PCR. *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtschaft., Berlin Dahlem, Heft 321*: 78-78.
- HONEE, G., VISSER, B. (1993): The mode of action of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Ent. Exp. App.* **69**: 145-155.
- HOOGENDOORN, M., HEIMPEL, G.E. (2001): PCR-based gut content analysis of insect predators: using ribosomal ITS-1 fragment from prey to estimate predation frequency. *Mol. Ecol.* **10**: 2059-2067.
- HORZ, H.-P. (2000): Entwicklung und Anwendung molekularer Techniken zur Charakterisierung von nitrifizierenden und methanotrophen Populationen in natürlichen Ökosystemen. Philipps-Univ. Marburg, Fachbereich Biologie, Dissertation.
- HORZ, H.-P., ROTTHAUWE, J.-H., LUKOW, T., LIESACK, W. (2000): Identification of major subgroups of ammonia-oxidizing bacteria in environmental samples by T-RFLP analysis of *amoA* PCR products. *J. Microb. M.* **39**: 197-204.
- HOSANG, B. (1985): Untersuchungen zum Maiszünsler-vorkommen (*Ostrinia nubilalis* Hüb.) an Beifuß und Mais im Ruhrgebiet unter besonderer Berücksichtigung der Rassenzugehörigkeit und Entwicklungsgeschwindigkeit. Technische Hochschule Darmstadt, Fachbereich Biologie, Diplomarbeit.
- HOY, M.A. (1994): *Insect Molecular Genetics. An Introduction to Principles and Applications*. Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney,

- Tokyo, Toronto: 1-546.
- HUANG, F., BUSCHMAN, L. L., HIGGINS, R.A., MCGAUGHEY, W.H. (1999): Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin (Dipel ES) in the European corn borer. *Science* **284**: 965-967.
- HUGGER, H. (1998): Was ist von Transgenen Maissorten zu erwarten. *Journal Mais* **26**: 112-113.
- INDIK, Z.K., TARTOF, K.D. (1980): Long spacer among ribosomal genes of *Drosophila melanogaster*. *Nature* **284** (5755): 477-479.
- KALB, M., NOLL, H. (1990): Klimadaten von Europa Teil I: Nord-, West- und Mitteleuropa. DWD Deutscher Wetterdienst, 2. Aufl., Selbstverlag des Deutschen Wetterdienstes, Offenbach am Main, A 76.
- KAMBHAMPATI, S., BLACK, W.C., RAI, K.S. (1992): A RAPD-PCR based method for the identification and Differentiation of mosquito populations. *Techniques and statistical analyses. J. Med. Ent.* **29**: 939-945.
- KANIA, C. (1968): Das Auftreten und die Verbreitung des Maiszünslers – *Ostrinia nubilalis* (Hbn.) (Lep., Pyralidae) – auf Mais im südwestlichen Teil Polens in den Jahren 1954-1976. *Abh. Ber. Naturkundemus. Görlitz* **44**: 211-219.
- KIM, C-G., HOSHIZAKI, S., HUANG, Y-P., TATSUKI, S., ISHIKAWA, Y. (1999): Usefulness of mitochondrial COII gene sequences in examining phylogenetic relationships in the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*, and allied species (Lepidoptera. Pyralidae). *Appl. Ent. Zo.* **34**: 405-412.
- KIRK, A.A., LACEY, L.A., BROWN, J.K., CIOMPERLIK, M.A., GOOLSBY, J.A., VACEK, D.C., WENDEL, L.E., NAPOMPETH, B. (2000): Variation in the *Bemisia tabaci* s. l. species complex (Hemiptera: Aleyrodidae) and its natural enemies leading to successful biological control of *Bemisia* biotypes B in the USA. *B. Ent. Res.* **90**: 317-327.
- KLAPPENBACH, J.A., DUNBAR, J.M., SCHMIDT, T.M. (2000): rRNA Operon Copy number Reflects Ecological Strategies of Bacteria. *Appl. Envir.* **66**: 1328-1333.
- KLUGE, E., ENZIAN, S., GUTSCHE, V. (1999): Befallsatlas - Atlas der potentiellen Befallsgefährdung durch wichtige Schadorganismen im Ackerbau Deutschlands. BBA Berlin und Braunschweig (Hrsg.), Saphir Verlag: 1-160.
- KNOWLES, B.H. (1994): Mechanism of Action of *Bacillus thuringiensis* Insecticidal δ -Endotoxins. In: *Advances in Insect Physiology*. EVANS, P.D., HARCOUT BRACE & Company (Hrsg.), Academic Press Limited, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Toronto, Tokyo: 275-309.
- KOVACH, W.L. (1999): MVSP – A MultiVariate Statistical Package for Windows, ver. 3.1. Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, U.K.
- KRAUS, M., SCHREITER, G., MORITZ, G. (1998): Molekulargenetische Studien von Thripsenarten. *Proceedings sixth International Symposium on Thysanoptera, Antalya Turkey, April 27-May 1*: 77-80.
- KRIEG, A. (1986): *Bacillus thuringiensis*, ein mikrobielles Insektizid: Grundlagen und Anwendung. *Acta Phytomedica* **10**, Paul Parey, Berlin, Hamburg: 1-191.
- KRIEG, A., FRANZ, J. (1989): Lehrbuch der biologischen Schädlingsbekämpfung. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg: 1-302.
- KRONBERG, I. (1993): Schädlingsbekämpfung durch Schädlingsrefugien. *Biologie unserer Zeit* **23**, Heft **3**: 147.
- LANE DJ (1991): 16s/23sRNA sequencing. In: *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. STACKEBRANDT E, GOODFELLOW M. (Hrsg.), John Wiley & Sons, New York: 115-175.
- LANGENBRUCH, G.A., HOMMEL, B., BURGERMEISTER, W. (2000): Monitoring der Anpassung des Maiszünslers an transgenen *Bacillus thuringiensis*-Mais -

- Populationsgenetische Untersuchungen in ausgewählten Anbauregionen Deutschlands. In Biologische Sicherheit Proceedings zum BMBF-Statusseminar 29. - 30. Juni 1999, SCHIEMANN, J. (Hrsg.), Braunschweig: 5–10.
- LANGENBRUCH, G.A., KLEESPIES, R.G. (1998): Die Ausbreitung des Maiszünslers und die Verbreitung seiner Mikrosporidien. Mitt. Biol. Bundesanstalt. Land-Forstwirtschaft., Berlin-Dahlem, Heft **357**.
- LANGENBRUCH, G.A., WELLING, M. HOSANG, B. (1985): Untersuchungen über den Maiszünslers im Ruhrgebiet. Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. **37**: 150-156.
- LAWYER, F.C., STOFFEL, S., SAIKI, CHANG, S-Y., LANDRE, P.A., ABRAMSON, R.D., GELFAND, D.H. (1993): High-level Expression, Purification, and Enzymatic Characterization of Full-length *Thermus aquaticus* DNA Polymerase and Truncated Form Deficient in 5' to 3' Exonuclease Activity. PCR Methods and Applications **2**: 275-287.
- LEO, N.P., BARKER, S.C. (2002): Intragenomic variation in ITS2 rDNA in the louse of humans, *Pediculus humanus*: ITS2 is not a suitable marker for population studies in this species. Insec. Mol. B. **11**: 651.
- LEWIN, R. (1994): Fact, fiction and fossil DNA. New. Sci. **141**: 38-41.
- LIM, S.-H., TENG, P.C., LEE, Y.-H., GOH, C.-J. (1999): RAPD-Analysis of Some Species in the Genus *Vanda* (Orchidaceae). Ann. Botany **83**: 193-196.
- LIMA, L. H.C., NÁVIA, D., INGLIS, P. W., DE OLIVEIRA, M. R. V. (2000): Survey of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes in Brazil using RAPD markers. Genet. Mol. B. **23**: 781-785.
- LINN, C., O'CONNOR, M., ROELOFS, W. (2003): Silent genes and rare males: A fresh at pheromone blend response specificity in the European corn borer moth, *Ostrinia nubilalis*. J. Insect Science **3**: 15.
- LINNERT, G., ODENBACH, W. (1997): Genomkartierung mit molekularen Markern. In: Biologische Grundlagen der Pflanzenzüchtung. ODENBACH, W. (Hrsg.), Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, Wien: 324 – 349.
- LIU, W-T., MARSH, T.L., CHENG, H., FORNEY, L.J. (1997): Characterisation of Microbial Diversity by Determining Terminal Restriction Fragment Length Polymorphisms of Genes Encoding 16S rRNA. Appl. Envir. **63**: 4516 – 4522.
- LOMBARD, V., BARIL, C.P., DUBREUIL, P., BLOUET, F., ZHANG, D. (1999): Potential use of AFLP markers for the distinction of rapeseed cultivars. <<http://www.regional.org.au/au/gc/irc/4/587.htm>>
- LORENZ, H.-N. (1993): Untersuchungen 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. Georg-August-Univ. zu Göttingen, Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz, Abteilung Entomologie, Dissertation.
- LOSEY, J.E., CALVIN, D.D., CARTER, M.E., MASON, C.E. (2001): Evaluation of Noncorn Host Plant as a Refuge in a Resistance Management Program for European Corn Borer (Lepidoptera: Crambidae) on Bt-Corn. Env. Entomol. **30**: 728-735.
- LOSEY, J.E., CARTER, M.E., SILVERMAN, S.A. (2002): The effect of stem diameter on European corn borer behavior and survival: potential consequences for IRM in Bt-corn. Ent. Exp. App. **105**: 89-96.
- LOSEY, J.E., RAYOR, L.S., CARTER, M.E. (1999): Transgenic pollen harms monarch larvae. Nature **399**: 214.
- LOU, K.F., WEISS, M.J., BRUCKNER, P.L., MORRILL, W.L., TALBERT, L.E., MARTIN, J.M. (1998): RAPD variation within and among geographic populations of wheat stem sawfly (*Cephus cinctus* Norton). J. Heredity **89**: 329-335.
- LOUGHEED, S.C., GIBBS, H.L., PRIOR, K.A., WEATHERDEAD, P.J. (2000): A Comparison

- of RAPD Versus Microsatellite DNA Markers in Population Studies of the Massasauga Rattlesnake. *The American Genetic Association* **91**: 458-463.
- LOXDALE, H.D., LUSHAI, G. (1998): Molecular markers in entomology. *B. Ent. Res.* **88**: 577-600.
- LYNCH, M. (1990): The similarity index and DNA fingerprinting. *Mol. Biol.* **7**: 478-484.
- LYNCH, M., MILLIGAN, B.G. (1994): Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.* **3**: 91-99.
- MAILER, R.J., SCARTH, R., FRSTENSKY, B. (1994): Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica nupus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theor. A. Gen.* **87**: 697-704.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J. (1989): *J. Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (New York, USA).
- MANTEL, N. (1967): The detection of disease clustering and a generalised regression approach. *Cancer Res.* **27**: 209-220.
- MARCON, P.C.R.G., TAYLOR, D.B., MASON, C.E., HELLMICH, R.L., SIEGFRIED, B.D. (1999): Genetic similarity among pheromone and voltinism races of *Ostrinia nubilalis* (Huebner) (Lepidoptera: Crambidae). *Insec. Mol. B.* **8**: 213-221.
- MARGARITOPOULOS, J.T., BACANDRITSOS, N., PEKAS, A.N., STAMATIS, C., MAMURIS, Z., TSITSIPIS, J.A. (2003): Genetic variation of *Marchalina hellenica* (Hemiptera: Margarodidae) sampled from different hosts and localities in Greece. *B. Ent. Res.* **93**: 447-453.
- MARTIN, G.B., WILLIAMS, J.G.K., TANKSLEY, S.D. (1991): Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and near-isogenic lines. *PNAS* **88**: 2336-2340.
- MARTINEZ, S.S., DE CARVALHO, O.R., VIEIRA, L.G. (2000): Identification, Geographical Distribution and Host Plants of *Bemisia tabaci* (Genn.) Biotypes (Homoptera:Aleyrodidae) in the State of Paraná, Brazil. *An. Soc. Entomol. Brasil* **29**: 597-603.
- MARUTHI, M.N., COLVIN, J., SEAL, S. (2001): Mating compatibility, life-history traits, and RAPD-PCR variation in *Bemisia tabaci* associated with the cassava mosaic disease pandemic in East Africa. *Ent. Exp. App.* **99**: 13-23.
- MCGAUGHEY, W.H. (1994): Implications of cross-resistance among *Bacillus thuringiensis* toxins in resistance management. *Biocontrol Science and Technology* **4**: 427-435.
- MENNECHEZ, G., SHTICKZELLE, N., BAGUETTE, M. (2003): Metapopulation dynamics of the bog fritillary butterfly: comparison of demographic parameters and dispersal between a continuous and a highly fragmented landscape. *Landsc. Ecol.* **18**: 279-291.
- MEUNIER, J.K., GRIMONT, P.A.D. (1993): Factors affecting reproducibility of random polymorphic DNA fingerprinting. *Res. Microb.* **144**: 373-379.
- MICHELMORE, R.W., PARAN, I., KESSELI, R.V. (1991): Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *PNAS* **88**: 9828-9832.
- MOYA, A., GUIRAO, P., CIFUENTES, D., BEITIA, F., CENIS, J. L. (2001): Genetic diversity of Iberian populations of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) based on random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction. *Mol. Ecol.* **10**: 891-897.
- MÜHLHARD, C. (2002): *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akad. Verl., 3. Aufl., Heidelberg, Berlin: 1-267.
- MÜLLER, H.-J. (2001b): *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)*. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, Berlin: 1-134.

- MÜLLER, P., KAUTENBURGER, R., ELLE, O., SCHMITT, T., EISENBARTH, D., GASSERT, F., LANGER M., QUACK, M., PETER, T., RÖLKER, T. (2002): Veränderungen und Anpassungsprozesse von Tier- und Pflanzenpopulationen in agrarisch und frostwirtschaftlich genutzten Ökosystemen der Region Trier <http://www.fews12.uni-trier.de:8080/sfb-web/publikationen/ergebnis/B7_Mueller.pdf>
- MÜLLER, W. (2001a): Handbuch zu Monitoring und Resistenzmanagement für *Bt*-Mais. Umweltbundesamt GmbH (Hrsg.), Spittelauer Lände, Wien, Monographien, Bd. 144: 1-64.
- MÜLLER-WESTERMEIER, G. (1996): Klimadaten von Deutschland: Zeitraum 1961-1990 (Lufttemperatur, Luftfeuchte, Niederschlag, Sonnenschein, Niedernberg, Sonnenschein, Bewölkung). Offenbach: Dt. Wetterdienst: 1-431.
- MUYZER G., SMALLA, K. (1998): Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Leeuwenhoek* **73**: 127-141.
- NAGARAJU, J., GOLDSMITH, M.R. (2002): Silkworm genomics – progress and prospects. *Current Sci.* **83**: 415-425.
- NEEMANN, G., BRAUN, P. (1997): Freisetzungspraxis und ökologische Begleitforschung In: Zukunft der Gentechnik. BRANDT, P. (Hrsg.), Birkhäuser, Basel, Boston, Berlin: 189-206.
- NEI, M. (1972): Genetic Distance between Populations. *Am. Natural.* **106**: 283-292.
- NEI, M. (1988): Relative roles of mutation and selection in the maintenance of genetic variability. *Phi. T. Roy. A.* **319**: 615-629.
- NEI, M., LI W. H. (1979): Mathematical models for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS* **76**: 5269-5273.
- NOTHNAGEL, T., STRAKA, P. (2004): Forschungsobjekt Möhre (*Daucus carota* L. sativus Hoffm.) <http://www.bafz.de/baz99_d/baz_orte/qlb/igk/moehre.htm>.
- NÜBEL, U., ENGELEN, B., FELSKE, A., SNAIDR, J., WIESHUBER, A., AMANN, R., LUDWIG, W., BACKHAUS, H. (1996): Sequence Heterogeneities of Genes Encoding 16S rRNA in *Paenibacillus polymyxa* Detected by Temperature Gradient Gel Electrophoresis. *J. Bact.* **178**: 5636-5643.
- ODORICO, D.M., MILLER, D.J. (1997): Variation in the Ribosomal Internal Transcribed Spacers and 5.8S rDNA Among Five Species of *Acropora* (Cnidaria; Scleractinia): Patterns of Variation Consistent with Reticulate Evolution. *Mol. Biol.* **14**: 465-473.
- OERKE, E.-C., STEINER, U. (1996): Die Anbausituation für die wirtschaftlich wichtigsten Kulturpflanzen, Ertragsverluste und Pflanzenschutz. Schriftenreihe der Deutschen Phytomedizinischen Gesellschaft. Eugen Ulmer GmbH & Co, Stuttgart (Hohenheim), Bd. 6: 1-165.
- ONSTAD, D., GUSE, C. (1999): Economic Analysis of Transgenic Maize and Nontransgenic Refuges for Managing European Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Ent.* **92**: 1256-1265.
- PARAN, I., KESSELI, R., MICHELMORE, R. (1991): Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. *Genome* **34**: 1021-1027.
- PASHLEY, D., JOHNSON, S.J., SPARKS, A.N. (1985): Genetic Population Structure of Migratory Moths: The Fall Armyworm (Lepidoptera:Noctuidae). *Ann. Ent. S. A.* **78**: 756-762.
- PASTRIK, K.-H. (1995): Differenzierung von Kartoffelnematoden (*Globodera* spp.) anhand amplifizierter DNA-Fragmente. Technischen Univ. Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Dissertation.
- PASTRIK, K.-H., RUMPENHORST, H.-J., BURGERMEISTER, W. (1995): Random amplified

- polymorphic DNA analysis of a *Globodera pallida* population selected for virulence. *Fundam. Appl. Nematol.* **18**: 109-114.
- PERLAK, F.J., FUCHS, R.L., MCPHERSON, S.L., FISCHHOFF, D.A. (1991): Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control genes. *PNAS* **88**: 3324-3328.
- PILCER, C.D., OBRYCKI J.J., RICE, M.E., LEWIS, L.C. (1997): Preimaginal development, survival and field abundance of insect predators on transgenic *Bacillus thuringiensis* corn. *Env. Entomol.* **26**: 446-454.
- POPKO (1988): Beobachtungen zum Auftreten des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis* Hbn.) an Silomais. *Nachrichtenblatt für den Pflanzenschutz in der DDR* **5**: 110-112.
- PORNIKULWAT, S., SKODA, S., 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. Ent. S.A.* **91**: 719-725.
- PORTER, C.H., COLLINS, F.H. (1991): Species-diagnostic differences in a ribosomal DNA internal transcribed spacer from the sibling species *Anopheles hermsi* (Diptera: Culicidae). *Am. J. Trop. M.* **45**: 271-279.
- POSSO, C.E., GONZÁLEZ, R., CÁRDENAS, H., GALLEGU, G., DUQUE, M.C., SUAREZ, M.F. (2003): Random Amplified Polymorphic DNA Analysis of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) from Western and Northeastern Colombia. *Mem. I. Osw. C.* **98**: 469-476.
- PUTERKA, G.J., BLACK, W.C., IV, STEINER, W.M., BURTON, R.L. (1993): Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collection of the russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. *Heredity* **70**: 604-618.
- RASPUDIC, E., IVEZIC, M., BRMEZ, M. (2002): European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) tunnelling OS corn hybrids. In: Abstracts of the VIIth European Congress of Entomology. October 7-13 Thessaloniki Greece: 1-341.
- RAUSHER, M.D. (2001): Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature* **411**: 857-864.
- REH, P. (1985): Untersuchungen zur Populationsdynamik des Maiszünslers *Ostrinia Nubilalis* Hbn. Univ. Hohenheim, Institut für Phytomedizin, Dissertation.
- REICH, M., GRIMM, V. (1996): Das Metapopulationskonzept in Ökologie und Naturschutz: Eine kritische Bestandsaufnahme. *Z. Ökologie Naturschutz* **5**: 123-139.
- REINEKE, A. (1998): Differenzierung von verschiedenen Populationen des Schwammspinners, *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera, Lymantriidae), mit Hilfe molekularer Marker. Univ. Hohenheim, Institut für Phytomedizin, Dissertation.
- REINEKE, A. ZEBNITZ, P.W. (1999): Nachweis des Vorkommens und der Verbreitung neuer Rassen des Schwammspinners in Baden-Württemberg. *Freiburger forstliche Forschung* **13**: 137-154.
- REYES, A., LINACERO, R., OCHANDO, M.D. (1997): Molecular genetic and integrated control: an universal genomic DNA microextraction method for PCR, RAPD, restriction and southern analysis. *IOBC WPRS Bulletin* **20**: 281-284.
- ROCHE (2000): Roche Molecular Biochemicals 2000. Biochemicals Catalog.
- ROCHE (2002): Broschüre Biochemica Pocket Guide, Lab FAQs-Find a Quick Solution. Roche (Hrsg.), 2. Auflage: 1-180.
- ROEHRDANZ, R.L., SZALANSKI, A.L., LEVINE, E. (2003): Mitochondrial DNA and ITS1 differentiation in geographical populations of northern corn rootworm, *Diabrotica barberi* (Coleoptera: Chrysomelidae): identification of distinct genetic populations. *Ann. Ent. S. A.* **96**: 901-913.
- SAEGLITZ, C., BARTSCH, D. (2003): Regulatory and associated political issues with respect to Bt transgenic maize in the European union. *J. Inver. Pat.* **83**: 107-109.

- SANGER, F., NICKLEIN, S., COULSON, A.R. (1977): Nucleotide sequencing with chainterminating inhibitors. *PNAS* **74**: 5463-5467.
- SCANPACK 3.0 (1997): Software Biometra a Whatsman company, Biometra biomedizinische Analytik GmbH, (C)opyright 1991 - 1996 by Dr. Dr. F.-H. Grus and Dr. J.H. Nuske, Kalkbergstr. 194, 52080 Aachen, FR Germany.
- SCHEIDER, M., MANDORF, TH. RUBACH, K. (1997): Tierartbestimmung von Fisch durch DNA-Analyse mittels RAPD-PCR. *Deut. Lebens.* **93**: 137-140.
- SCHLÖTTERER, C. (1998): Ribosomal DNA Probes and Primers. In: *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. KARP, A., ISAAC, P. G., INGRAM, D. S. (Hrsg.), Chapman & Hall, London, published by Chapman & Hall, London: 267-276.
- SCHMITZ, B., BURGERMEISTER, W., BRAASCH, H. (1998): Molecular genetic classification of Central European *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax* populations. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **50**: 310-317.
- SCHNIEDER, F., KOCH, G., JUNG, C., VERREET, J.-A. (1996): Nutzung von PCR-Markertechnik (RAPD, AFLP) zur genetischen Differenzierung von *Mycosphaerella graminicola* (anamorph *Septoria tritici*). *Mitt. Biol. Bundesanst. Land- Forstwirtsch., Berlin Dahlem*, Heft **321**: 81.
- SCHRADER, K. (1996): Taxonomische Charakterisierung von *Pezicula livida* (Berk. & Br.) Rehm, *Pezicula cinnamomea* (De Cand) Sacc. und *Pezicula carpinea* (Pers.) Tul. durch RAPD-Analyse und Sekundärmetabolitenspektrum. Technische Univ. Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Diplomarbeit.
- SCHRÖDER, G. (2000): Stopp für Beulenbrand, Fusarium und Zünsler. *Bauernzeitung* **18**: 22-23.
- SCHTICKZELLE, N., BOULENGÉ, E.L., BAGUETTE, M. (2002): Metapopulation dynamics of the bog fritillary butterfly: demographic processes in a patch population. *OIKOS* **97**: 346-360.
- SEARS, M.K., HELLMICH, R., STANLEY-HORN, D.E., OBERHAUSER, K.S., PLEASANTS, J.M., MATTILA, H.R., SIEGFRIED, B.D., DIVERLY, G.P. (2001): Impact of Bt corn pollen monarch butterfly populations: A risk assessment. *PNAS* **98**: 11937-11942.
- SHELTON, A.M., TANG, J.D., ROUSH, R.T., METZ, T.D., EARLE, E.D. (2000): Field tests on managing resistance to Bt-engineered plants. *Nat. Biotech.* **18**: 333-342.
- 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. *Env. Entomol.* **30**: 700-710.
- SHOWERS, W.B., WEISS, M.J., DERRICK, M.E., HENDRIX III, W.H. (1995): Potential movement on surface airflow of a bivoltine population of European corn borer (Pyralidae: Lepidoptera) into a historically univoltine habitat. *Env. Entomol.* **24**: 835-840.
- SHOWERS, W.B., WITKOWSKI, J.F., MASON, C.E., CALVIN, D.D., HIGGINS, R.A., DIVERLY, G.P. (1996): European Corn Borer Development and Management. North Central Regional Extension Publication No. 327, Iowa State University, Ames: 1-32.
- SIGURDSSON, V., HALLDORSSON G., SIGURGEIRSSON, A., THÓRSSON, E. T., ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K. (1999): Genetic differentiation of the green spruce aphid (*Elatobium abietinum* Walker), a recent invader to Iceland. *Agricultural and Forest Entomology* **1**: 157-163.
- SILVA, E.P., RUSSO, C.A. (2000): Techniques and statistical data analysis in molecular populations genetics. *Hydrobiol.* **420**: 119-135.
- SILVA, I.M.M.S., VAN KAN, F.J.P.M., VAN LENTEREN, J.C., STOUTHAMER, R. (1994): Analysis of Portuguese *Trichogramma* spp. (Hym., Trichogrammatidae) using ITS-rDNA and RAPDs. *Les colloques*, no. 73, 37-39.
- SMALLA, K. (2004): Culture-Independent Microbiology. In: *Microbial Diversity and*

- Bioprospecting, BULL, A.T. (Hrsg.), ASM Press, Washington, D.C.: 88-99.
- SMALLEY, D.L., OURTH, D.D. (1979): Bacterial genera isolated from field-collected (diapausing) and laboratory-reared cotton boll weevils, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). *J. Inver. Pat.* **34**: 158-163.
- SMITH, C.M. (1998). *Plant Resistance to Insects. A Fundamental Approach*. Wily, J. & Sons, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore: 1-286.
- SMITH, H.E. (1920): Broom corn, the probable host in which *Pyrausa nubilalis* reached America. *J. Econ. Ent.* **13**: 425-430.
- SMITH, J.J., SCOTT-CRAIG, J.S., LEADETTER, J.R., BUSH, G.L., ROBERTS, D.L., FULBRIGHT, D.W. (1994): Characterisation of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Products from *Xanthomonas campestris* and some comments on the use of RAPD products in phylogenetic analysis. *Mol. Phyl. Ev.* **3**: 135-145.
- SNEATH, P.H.A., SOKAL, R.R. (1973): *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. W. H. Freeman, San Francisco, USA, Stace, CA.
- SOBRAL, B.W.S., HONEYCUTT, R.J. (1993): High output genetic mapping of polyploids using PCR generated markers. *Theor. A. Gen.* **86**: 105-112.
- SOKAL, R.R., MITCHENER, C.D. (1958): A statistical method for evaluating systematic relationship. *University of Kansas, Science Bulletin* **38**: 1409-1438.
- STEINBRINK, H., OCKERT, G., SCHUSTER, W., SOMMER, S. (1989): *Gesundheitsschädlinge Einführung in Biologie und Bekämpfung*. Johann Ambrosius Barth, Leipzig: 1-250.
- STEINHAUSEN, D., LANGER, K. (1977): *Clusteranalyse: Einführung in Methoden und Verfahren der automatischen Klassifikation*. Walter de Gruyter & Co, Berlin, New York: 1-206.
- STEWART, G., SCHAAFSMA, A., SEARS, M. (1999): Practical considerations for Bt refuge management. *Ontario Corn Producers Association (OCPA) Magazine*. March.
- STILMANT, D., HANCE, T., NOEL-LASTELLE, CH. (1997): Discrimination of Belgian *Sitobion avenae* (F) populations by means of RAPD-PCR. *Acta Jutlandica* **72**: 139-148.
- STÖCKER, F.W., DIETRICH, G. (HSG.) (1986): *Biologie*. Bd. 1/A-Me, Brockhaus abc, F. A. Brockhaus Verlag, Leipzig, 7. Auflage.
- SUN, G.-L., DÍAZ, O., SALOMON, B., VON BOTHMER, R. (1999): Genetic diversity in *Elymus caninus* as revealed by isozyme, RAPD, and microsatellite markers. *Genome* **42**: 420-431.
- SZALANSKI, A.L., OWENS, C.B. (2003): Genetic Variation of The Southern Corn Rootworm, (Coleoptera: Chrysomelidae). *Florida Entomologist* **86**: 329-333.
- TABASHNIK, B.E. (1994): Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Ann. R. Entom.* **39**: 47-79.
- TABASHNIK, B.E., LIU, Y.B., FINSON, N., MASSON, L., HECKEL, D.G. (1997): One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *PNAS* **94**: 1640-1644.
- THOMAS, K., GRANT, S.E., POWELL, D.A. (2000): Background. Genetically-Engineered Bt-Containing Field Corn. <http://www.checkbiotech.org/blocks/dsp_document.cfm?doc_id=16>.
- TINGEY, S.V., DEL TUFO, J.P. (1993): Genetic Analysis with Random Amplified Polymorphic DNA Markers. *Plant. Physl.* **101**: 349 - 352.
- VAN RIE, J. (2000): *Bacillus thuringiensis* and its use in transgenic insect control technologies. *Urban & Fischer Verlag, Int. J. Med. M.* **290**: 463 - 469
- VANDEWOESTIJNE, S., BAGUETTE, M. (2002): The genetic structure of endangered populations in the Cranberry Fritillary, *Boloria aquilonaris* (Lepidoptera, Nymphalidae): RAPDs vs allozymes. *Heredity* **89**: 439-445.
- VANLERGERGHE-MASUTTI, F., CHAVIGNY, P. (1998): Host-based genetic differentiation

- in the aphid *Aphis gossypii* Glover, evidenced from RAPD fingerprints. *Mol. Ecol.* **7**: 905-914.
- VAUGHN, TY.T., ANTOLIN, M.F. (1998): Population genetics of an opportunistic parasitoid in an agricultural landscape. *Heredity* **80**: 152-162.
- WELLING, M. (1984): Vorkommen und Biologie des Maiszünslers (*Ostrinia nubilalis*) im Ruhrgebiet im Vergleich mit anderen Maiszünslerpöpopulationen. Univ. Mainz, Fachb. Biologie, Diplomarbeit.
- WELSH, J., MCCLELLAND, M. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acid. R.* **18**: 7213-7224.
- WILKE, S. (1926): Der Stand der Maiszünslfrage. *Archiv für Naturgeschichte, Abteilung A, STRAND, E. (Hrsg.), Heft 9*: 31-72.
- WILKERSON, R.C., PARSON, T.J., ALBRIGHT, D.G., KLEIN, T.A., BAUN, M.J. (1993): Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers readily distinguish cryptic mosquito species (Dipera. Culicidae. Anopheles). *Insec. Mol. B.* **1**: 205-211.
- WILLIAMS, J.G.K., HANAFEY, M.K., RAFALSKI, J.A., INGEY, S.V. (1993): Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. *Meth. Enzym.* **218**: 704-741.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A., TINGEY, S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid. R.* **18**: 6531-6535.
- WINK, M. WEHRLE, H. (1994): PCR im medizinischen und biologischen Labor, *Handbuch für den Praktiker. Git Verlag GmbH, Darmstadt*: 1-295.
- WITKOWSKI, J.F., WEDBERG, J.L., STEFFEY, K.L., SLODERBECK, P.E., SIEGFRIED, B.D., RICE, M.E., PILCHER, C.D., ONSTAD, D.W., MASON, C.E., LEWIS, L.C., LANDIS, D.A., KEASTER, A.J., HUANG, F., HIGGINS, R.A., HAAS, M.J., GRAY, M.E., GILES, K.L., FOSTER, J.E., DAVIS, P.M., CALVIN, D.D., BUSCHMAN, L.L., BOLIN, P.C., BARRY, B.D., ANDOW, D.A., ALSTAD, D.N. (1997): *Bt-corn & European Corn Borer- Long-Term Success Through Resistance Management. K.R. OSTLIE, W.D. HUTCHISON, R. L. HELLMICH (Hrsg.), University of Minnesota*: 1-16.
- WOESE, C.R. (1987): Bacterial Evolution. *Microbiological Reviews* **51**: 221-271.
- WRIGTH, S. (1943): Isolation by distance. *Genetics* **28**: 139-156.
- WRIGTH, S. (1978): Evolution and the genetics of populations. IV. Variability within and among natural populations. –Univ. Chicago Press, Chicago.
- WU, X., HU, D., LI, Z., SHEN, Z. (2002): Using RAPD-PCR to distinguish biotypes of *Bemisia Tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) in China. *Entomologica Sinica* **9**: 1-8.
- WYNNE, I.R., LOXDALE, H.D., BROOKES, C.P., WOIWOD, I.P. (2003): Genetic structure of fragmented November moth (Lepidoptera: Geometridae) populations in farmland. *Biol. J. Linn.* **78**: 467-477.
- YOON, C.S., GLAWE, D.A. (1993): Pretreatment with RNase to Improve PCR Amplifikation of DNA Using 10-Mer Primers. *Biotechniqu.* **14**: 908-910.
- ZAKHAROV, E.V. (2001): Natural Hybridisation between Two Swallowtail Species *Parnassius nomion* and *Parnassius bremeri* (Lepidoptera, Papilionidae) Shown by RAPD-PCR. *Russ. J. Gen.* **37**: 473-481.
- ZELLNER, M. (1994): Maiszünslerbekämpfung: Worauf kommt es an? *Pflanzenschutz-Praxis* **2**: 6-9.
- ZIMMERMANN, A., 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.
- ZWAHLEN, C. NENTWIG, W. BIGLER, F., HILBECK, A. (2000): Tritrophic Interactions of Transgenic *Bacillus thuringiensis* Corn, *Anaphothrips obscurus* (Thysanoptera: Thripidae), and the Predator *Orius majusculus* (Heteroptera: Anthocoridae). *Env.*

Entomol. **29**: 846 – 850.

ZWÖLFER, W. (1928a): Bericht über die Untersuchungen zur Biologie und Bekämpfung des Maiszünslers (*Pyrausta nubilalis* Hübn.) in Süddeutschland 1926. Verlagsbuchhandlung Paul Parey, Julius Springer, Arbeiten aus der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Heft **15**: 355-400.

ZWÖLFER, W. (1928b): Ergebnisse der Maiszünslernerhebungen in Süddeutschland. Mitt. deuts. Landw.-Ges., xliii: 267-271.

7 ANHANG

1. Standortbeschreibung

Tab. 1: Beschreibung der Standorte von *O. nubilalis*

1999

Standorte		Maisanbau			Feldanzahl und -größe	Befall Schätzung gering: bis 20 %, mittel: 21 – 70 %; hoch: über 70 %			Sammel- termin	Sammel- bedingungen	
allgemein	detailliert	Silo	Körner	CCM		gering	mittel	stark		Stoppel	Bestand
Oderbruch	Golzow	X			2 ca. 73/62 ha/Feld			X	30.9./ 1.10.99	X	
Halle	Spicken- dorf		X		1 ca. 50 ha		X		6.10.99	X	
Niedernberg	Niedern- berg Groß- Ostheim		X	X	10 0,5 - 5 ha/Feld		X		1. – 8. 11.	X	
Hessisches Ried	Gemeinde Riedstadt		X	X	9 0,5 – 7 ha/Feld		X		13. – 26. 10.	(X)	X
Pocking	Inntal Landreis Passau		X	X	10 4 – 10 ha/Feld	X			1. – 31. 10.		X
Karlsruhe	Walldorf Liedols- heim	X	X		2		X	X	2.7 - 16.7.	Falterfänge	

2000

Standorte		Maisanbau			Feldanzahl und -größe	Befall Schätzung gering: bis 20 %, mittel: 21 – 70 %; hoch: über 70 %			Sammel- termin	Sammelbedingungen	
allgemein	detailliert	Silo	Körner	CCM		gering	mittel	stark		Stoppel	Bestand
Oderbruch	Seelow	X			1 ca. 30 ha			X	14. – 18. 9.	X	X
Halle	Spicken- dorf		X		1 ca. 28 ha		X		4.10.	X	
Niedernberg	Niedern- berg Groß- Ostheim		X	X	12 0,5 – 5 ha/Feld	X	X		23. – 26. 10.	X	X
Hessisches Ried	Gemeinde Riedstadt		X	X	10 0,5 – 7 ha/Feld		X		16. – 30. 10.	(X)	X
Pocking	Inntal Landreis Passau		X	X	16 4 – 10 ha/Feld	X			26. – 28.9.		X
Karlsruhe	Walldorf Liedols- heim Laden-burg	X	X		3	X		X	20.6. – 10.7.	Falterfänge	
Bodensee	Gott- madingen Nenzin-gen Hilzingen		X		4 Felder hatten eine Abstand von ≈ 11 km	X	X		19.6. – 3. 7.		

2001

Standorte		Maisanbau			Feldanzahl und -größe	Befall Schätzung gering: bis 20 %, mittel: 21 – 70 %; hoch: über 70 %			Sammel- termin	Sammelbedingungen	
allgemein	detailliert	Silo	Körner	CCM		gering	mittel	stark		Stoppel	Bestand
Oderbruch	Gusow			X	1 ca. 2,2 ha			X	26.09	X	
Halle	Spickendorf		X		1 ca. 50 ha		X		2.10	X	
Niedernberg	Niedernberg Groß-Ostheim		X	X	10 2 – 10 ha/Feld	X	X		8. – 19. 10.	X	X
Hessisches Ried	Gemeinde Riedstadt		X	X	10 0,5 – 7 ha/Feld	X			23. – 30. 10.	(X)	X
Pocking	Inntal Landreis Passau		X	X	20 4 – 10 ha/Feld	X			13. – 15. 10.		X
Breisgau/ Freiburg	Riegel (Romanshöfe) Endingen (Wilhelmshöfe) Forchheim/Wyhl				3 Felder hatten einen Abstand von ≈ 3 km	X X			11.6. – 14. 7.	Falterfänge	
Bonn	Alfter/Vollm. (Borkeshof) Rheinbach/Ober- drees Euskirchen Bonn- Tannenbusch	X Bei- fuß			4 Felder hatten einen Abstand von ≈ 14 km		X X X		18.6. 6.8. 9.5.		X

2. Chemikalien und Geräte

Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Tab. 2a: **Extraktion**

Chemikalien	Firma
TE-Puffer	Fluka
EDTA	Fluka
Ethanol	Roth
Isopropanol	unbekannt
KAc	Merck
NaAc	Roth
NaCl	Roth
Quarzsand	Roth
SDS	Promega
Tris	ICN Biomedicals, Inc.

Tab. 2b: **PCR**

Chemikalien	Firma
Ampli-Taq-DNA-Polymerase (Stoffelfragment) inkl. 10 X Stoffel-Puffer und MgCl ₂	Applied Biosystems
Doppelt Destilliertes Wasser	Fluka
Gelladungspuffer (GLP) 6X	Promega
d NTP	Boehringer Mannheim, Roche
RAPD-Primer	Roth, MWG-Biotech AG
TE-Puffer	Fluka

Taq-Polymerase bei Mais

Tab. 2c: **Gelelektrophorese/Färbung**

Chemikalien	Firma
100 bp Ladder	GIBCO/BRL
Agarose Seakem [®]	Bio Whittaker Molecular Applications
Bromphenol Blau	Fluka
Destilliertes Wasser	Roth
Ehidiumbromid	SERVA, Elektrophoresis GmbH
MgSO ₄	Fluka
TAE-Puffer	Eppendorf

Tab. 2d: **DNA-Messung**

Chemikalien	Firma
Destilliertes Wasser	Roth
Farbstoff 33258	Hoechst
Kalbsthymus-DNA	Pharmacia
TAE-Puffer	Eppendorf

Tab. 2e: **RFLP**

Chemikalien	Firma
Restriktionsenzym Hae III	MBI Fermentas
Restriktionsenzym Rsa I	MBI Fermentas

Tab. 2f: **TGGE**

Chemikalien	Firma
50 X Mops Puffer	Roth (Art.6979.3)
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva (Art.13375)
ITS f und r Primer mit GC-Klammer	MWG-Biotech AG
Paraffinöl	Roth Art.9190.1
TEMED	Promega

Tab. 2g: **T-RFLP**

Chemikalien	Firma
BSA	New England Biolabs
HhaI, TaqI	New England Bio Labs
NEBuffer 4	New England Biolabs
POP 6-Polymer	PE Applied Biosystems
Rox-Standard	Applied Biosystems

Tab. 2h: **Sequenzierung**

Chemikalien	Firma
GA-Puffer	PE Applied Biosystems
Primer siehe Tab. 2b	
POP 6-Polymer	PE Applied Biosystems
Sephadex G-50	Pharmacia
Terminationsmix Big Dye®	Applied Biosystems
TSR-Puffer	PE Applied Biosystems

Tab. 3: Geräte und Hilfsmittel wurden von folgenden Firmen bezogen:

Geräte und Hilfsmittel	Firma	angewandte Methode
A 14 Tischzentrifuge	Jouan	Sequenzierung
CCD Video Kamera RA 1	KAISER	Gelelektrophorese
Elektrodenkammer	Eigenbau	TGGE
Elektrodenlappen	Flinka, Allzwecktuch (Art.-Nr.386/620020)	TGGE
Elektrophorese-Kammer	Owl Scientific, inc. Woburn, MA USA	T-RFLP
Filterpapier	Filtrak GmbH	Gelelektrophorese
Fluorimeter DyNA Quant 200	Pharmacia Biotech	
Gelkamm, Gelkammer; Gelträger	Hoefer	Gelelektrophorese
Kapillare (50 µm, 47 cm)	PE Applied Biosystems	T-RFLP, Sequenzierung
Kapillare (50 µm, 61 cm)	PE Applied Biosystems	Sequenzierung
Kühlzentrifuge MR 1822	Jouan	Extraktion, PCR
Küvette	amersham Pharmacia biotech	DNA-Messung
Mikrowelle	Alaska	Gelelektrophorese
Mörser und Pistill	Roth	Extraktion
Multi Temp II	Pharmacia	Gelelektrophorese
PCR-Thermal Cycler PTC 200	Biozym	PCR
Sequenzierer ABI Prims 310 Genetic Analyzer	PE Biosystems (64331 Walterstadt)	Sequenzierung, T-RFLP
Skalpell		Extraktion
Spannungsgerät	Serva, Blue Power 500	TGGE
Spatel	Roth	Extraktion
Spectrophotometer U-2010	Hitachi	Sequenzierung
Speed Vac	Jouan	Extraktion
Sterilfilter-Pipettenspitzen für PCR	Biozym	PCR
Stromversorgungsgeräte	Pharmacia	Gelelektrophorese
Thermocycler 2400		T-RFLP
Thermocycler Gene Amp PCR System 9700	PE Applied Biosystems	Sequenzierung
Tiefkühlgeräte	Siemens	PCR, Extraktion
Tischzentrifuge EBA 12	Fröbel Labor Technik	PCR, Extraktion, DNA- Reinigung
UV-Tisch	Labortechnik	Gelelektrophorese
Vakuumbzentrifuge RC 10.10	Jouan	Sequenzierung
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz	Extraktion
Wasserbad	Bandelin	Extraktion
Wasserbad Sonorex Super 10 P	Bandelin	Extraktion
Wippe Rocky	Fröbel Labor Technik	Gelelektrophorese

3. Puffer und Lösungen (selbst hergestellt)

Extraktion

Extraktionspuffer

100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 500 mM NaCl; 50 mM EDTA, pH 8,0

DNA-Fluoreszenzmessung

10 X TNE-Puffer

12,11 g	Tris (100 mM)
3,72 g	EDTA Na ₂ + 2 H ₂ O (10 mM)
116,89 g	NaCl

Pulver in 800 ml HPLC-Wasser geben und mit HCl einen pH von 7,4 einstellen. Danach mit HPLC-Wasser auf 1000 ml auffüllen. Puffer ist für drei Monate bei 4 °C aufzubewahren.

Hoe 33258

10 mg Hoe 33258 in 10 ml HPLC-Wasser (in dunkler Flasche aufbewahren) lösen

Probenlösung A (Farbstofflösung, Hoe 33258) 1mg/ml

Ansetzung:	10 µl	Hoe 33258
	10 ml	10 X TNE
	90 ml	dd Wasser

TGGE

50 X MOPS-Puffer (pH 8,0) für 500 ml

104,65 g	MOPS
50 ml	EDTA 0,5 M (pH 8,0)

TGGE-Stammlösung (500 ml)

240,4 g	8 M Urea
77,8 ml	dd Wasser
100 ml	Acrylamid 30 %
100 ml	Formamid
11,5 ml	Glyzerin 85 %
10 ml	50 X MOPS-Puffer

leicht erwärmen, auf 500 ml mit dd Wasser auffüllen und anschließend filtrieren

Gelladungspuffer (5X)

200 mM	MOPS
10 mM	EDTA
0,05 %	Bromphenolblau
0,05 %	Xylencyanol (pH 8,0)

Silberfärbung

Fixierlösung:	10 %	Ethanol
	0,5 %	Essigsäure
Färbelösung:	150 ml	Fixierlösung
	0,3 g	Silbernitrat (0,2 %)
Entwicklerlösung:	150 ml	Natriumhydroxid (3 %)
	0,4 ml	Formaldehyd (37 %)
Konservierungslösung:	28,5 ml	Glycerin (85 %)
	62,5 ml	Ethanol
	159 ml	Destilliertes Wasser

Sequenzierung

Reinigung der PCR-Produkte

- 10 g Sephadex G-50 (Pharmacia) werden in 150 ml $\frac{1}{4}$ TE-Puffer resuspendiert und einen Tag lang quellen gelassen; Lagerung bei 4°C
- 750 μ l Suspension wird in ein Röhrchen mit eingesetzten Filter gegeben; 10 min bei Raumtemperatur stehen
- Zentrifugation für 2 min bei 800 g
- Überführung des Filters auf ein neues 1,5 ml Tube und Beladung der Säule mit dem PCR-Produkt
- Zentrifugation für 2 min bei 800 g
- Entfernung des Filters und Überführung des PCR-Produktes in ein Reaktionsgefäß

4. Alignment der *O. nubilalis*-Populationen

	5	15	25	35	45	55
Bodensee	-----	-TACTACCGA	TTGAATGATT	TAGTGAGGTC	TTCGGACCGA	CACGCGGTGG
Freiburg	CCGCCCCTCG	CTACTACCGA	TTGAATGATT	TAGTGAGGTC	TTCGGACCGA	CACGCGGTGG
Frankreich	CCGCCCCTCG	CTACTACCGA	TTGAATGATT	TAGTGAGGTC	TTCGGACCGA	CACGCGGTGG
Hess. Ried	CCGCCCCTCG	CTACTACCGA	TTGAATGATT	TAGTGAGGTC	TTCGGACCGA	CACGCGGTGG
Karlsruhe	-----	-TACTACCGA	TTGAATGATT	TAGTGAGGTC	TTCGGACCGA	CACGCGGTGG
Pocking	-----	--ACTACCGA	TTGAATGATT	TAGTGAGGTC	TTCGGACCGA	CACGCGGTGG
Polen	CCGCCCCTCG	CTACTACCGA	TTGAATGATT	TAGTGAGGTC	TTCGGACCGA	CACGCGGTGG
Niedernberg	CCGCCCCTCG	CTACTACCGA	TTGAATGATT	TAGTGAGGTC	TTCGGACCGA	CACGCGGTGG
Oderbruch	CCGCCCCTCG	CTACTACCGA	TTGAATGATT	TAGTGAGGTC	TTCGGACCGA	CACGCGGTGG
Tier1_Oderb	-----	---CTACCGA	TTGAATGATT	TAGTGAGGTC	TTCGGACCGA	CACGCGGTGG
Tier2_Oderb	CCGCCCCTCG	CTACTACCGA	TTGAATGATT	TAGTGAGGTC	TTCGGACCGA	CACGCGGTGG
Goettingen	CCGCCCCTCG	CTACTACCGA	TTGAATGATT	TAGTGAGGTC	TTCGGACCGA	CACGCGGTGG
Bonn	-----	-TACTACCGA	TTGAATGATT	TAGTGAGGTC	TTCGGACCGA	CACGCGGTGG
Lintel	-----	-TACTACCGA	TTGAATGATT	TAGTGAGGTC	TTCGGACCGA	CACGCGGTGG

	65	75	85	95	105	115
Bodensee	CTTCACGGCC	GTCGGCGTTG	CTGGGAAGTT	GACCAAACCT	GATCATTTAG	AGGAAGTAAA
Freiburg	CTTCACGGCC	GTCGGCGTTG	CTGGGAAGTT	GACCAAACCT	GATCATTTAG	AGGAAGTAAA
Frankreich	CTTCACGGCC	GTCGGCGTTG	CTGGGAAGTT	GACCAAACCT	GATCATTTAG	AGGAAGTAAA
Hess. Ried	CTTCACGGCC	GTCGGCGTTG	CTGGGAAGTT	GACCAAACCT	GATCATTTAG	AGGAAGTAAA
Karlsruhe	CTTCACGGCC	GTCGGCGTTG	CTGGGAAGTT	GACCAAACCT	GATCATTTAG	AGGAAGTAAA
Pocking	CTTCACGGCC	GTCGGCGTTG	CTGGGAAGTT	GACCAAACCT	GATCATTTAG	AGGAAGTAAA
Polen	CTTCACGGCC	GTCGGCGTTG	CTGGGAAGTT	GACCAAACCT	GATCATTTAG	AGGAAGTAAA
Niedernberg	CTTCACGGCC	GTCGGCGTTG	CTGGGAAGTT	GACCAAACCT	GATCATTTAG	AGGAAGTAAA
Oderbruch	CTTCACGGCC	GTCGGCGTTG	CTGGGAAGTT	GACCAAACCT	GATCATTTAG	AGGAAGTAAA
Tier1_Oderb	CTTCACGGCC	GTCGGCGTTG	CTGGGAAGTT	GACCAAACCT	GATCATTTAG	AGGAAGTAAA
Tier2_Oderb	CTTCACGGCC	GTCGGCGTTG	CTGGGAAGTT	GACCAAACCT	GATCATTTAG	AGGAAGTAAA
Goettingen	CTTCACGGCC	GTCGGCGTTG	CTGGGAAGTT	GACCAAACCT	GATCATTTAG	AGGAAGTAAA
Bonn	CTTCACGGCC	GTCGGCGTTG	CTGGGAAGTT	GACCAAACCT	GATCATTTAG	AGGAAGTAAA
Lintel	CTTCACGGCC	GTCGGCGTTG	CTGGGAAGTT	GACCAAACCT	GATCATTTAG	AGGAAGTAAA

	125	135	145	155	165	175
Bodensee	AGTCGTAACA	AGGTTTCCGT	AGGGGAACCT	GCGGAAGGAT	CATTAACGTG	TACGTTTACA
Freiburg	AGTCGTAACA	AGGTTTCCGT	AGGGGAACCT	GCGGAAGGAT	CATTAACGTG	TACGTTTACA
Frankreich	AGTCGTAACA	AGGTTTCCGT	AGGGGAACCT	GCGGAAGGAT	CATTAACGTG	TACGTTTACA
Hess. Ried	AGTCGTAACA	AGGTTTCCGT	AGGGGAACCT	GCGGAAGGAT	CATTAACGTG	TACGTTTACA
Karlsruhe	AGTCGTAACA	AGGTTTCCGT	AGGGGAACCT	GCGGAAGGAT	CATTAACGTG	TACGTTTACA
Pocking	AGTCGTAACA	AGGTTTCCGT	AGGGGAACCT	GCGGAAGGAT	CATTAACGTG	TACGTTTACA
Polen	AGTCGTAACA	AGGTTTCCGT	AGGGGAACCT	GCGGAAGGAT	CATTAACGTG	TACGTTTACA
Niedernberg	AGTCGTAACA	AGGTTTCCGT	AGGGGAACCT	GCGGAAGGAT	CATTAACGTG	TACGTTTACA
Oderbruch	AGTCGTAACA	AGGTTTCCGT	AGGGGAACCT	GCGGAAGGAT	CATTAACGTG	TACGTTTACA
Tier1_Oderb	AGTCGTAACA	AGGTTTCCGT	AGGGGAACCT	GCGGAAGGAT	CATTAACGTG	TACGTTTACA
Tier2_Oderb	AGTCGTAACA	AGGTTTCCGT	AGGGGAACCT	GCGGAAGGAT	CATTAACGTG	TACGTTTACA
Goettingen	AGTCGTAMCA	AGGTTTCCGT	AGGGGAACCT	GCGGAAGGAT	CATTAACGTG	TACGTTTACA
Bonn	AGTCGTAACA	AGGTTTCCGT	AGGGGAACCT	GCGGAAGGAT	CATTAACGTG	TACGTTTACA
Lintel	AGTCGTAACA	AGGTTTCCGT	AGGGGAACCT	GCGGAAGGAT	CATTAACGTG	TACGTTTACA


 ITS-1

Anhang

 185 195 205 215 225 235
Bodensee	TGTGATACAC	AAGTGTCTATG	TGGGAATGAT	CATACAATAA	TCCAGACACA	AAACAAAAGT
Freiburg	TGTGATACAC	AAGTGTCTATG	TGGGAATGAT	CATACAATAA	TCCAGACACA	AAACAAAAGT
Frankreich	TGTGATACAC	AAGTGTCTATG	TGGGAATGAT	CATACAATAA	TCCAGACACA	AAACAAAAGT
Hess. Ried	TGTGATACAC	AAGTGTCTATG	TGGGAATGAT	CATACAATAA	TCCAGACACA	AAACAAAAGT
Karlsruhe	TGTGATACAC	AAGTGTCTATG	TGGGAATGAT	CATACAATAA	TCCAGACACA	AAACAAAAGT
Pocking	TGTGATACAC	AAGTGTCTATG	TGGGAATGAT	CATACAATAA	TCCAGACACA	AAACAAAAGT
Polen	TGTGATACAC	AAGTGTCTATG	TGGGAATGAT	CATMCAATAA	TCCAGMCMCA	AAACAAAAGT
Niedernbe	TGTGATACAC	AAGTGTCTATG	TGGGAATGAT	CATACAATAA	TCCAGACACA	AAACAAAAGT
Oderbruch	TGTGATACAC	AAGTGTCTATG	TGGGAATGAT	CATACAATAA	TCCAGACACA	AAACAAAAGT
Tier1_Oderb	TGTGATACAC	AAGTGTCTATG	TGGGAATGAT	CATACAATAA	TCCAGACACA	AAACAAAAGT
Tier2_Oderb	TGTGATACAC	AAGTGTCTATG	TGGGAATGAT	CATACAATAA	TCCAGACACA	AAACAAAAGT
Goettingen	TGTGATACAC	AAGTGTCTATG	TGGGAATGAT	CATMCAATAA	TCCAGACACA	AA-CAAAAGT
Bonn	TGTGATACAC	AAGTGTCTATG	TGGGAATGAT	CATACAATAA	TCCAGACACA	AA-CAAAAGT
Lintel	TGTGATACAC	AAGTGTCTATG	TGGGAATGAT	CATACAATAA	TCCAGACACA	AA-CAAAAGT

 245 255 265 275 285 295
Bodensee	TCTGATCGAA	GGAAGGTCTC	GTTTAATTAT	GAGATCGTTC	GACGATKGGC	GTCGTMCGAT
Freiburg	TCTGATCGAA	GGAAGGTCTC	GTTTAATTAT	GAGATCGTTC	GACGATKGGC	GTCGTMCGAT
Frankreich	TCTGATCGAA	GGAAGGTCTC	GTTTAATTAT	GAGATCGTTC	GACGATKGGC	GTCGTMCGAT
Hess. Ried	TCTGATCGAA	GGAAGGTCTC	GTTTAATTAT	GAGATCGTTC	GACGATKGGC	GTCGTMCGAT
Karlsruhe	TCTGATCGAA	GGAAGGTCTC	GTTTAATTAT	GAGATCGTTC	GACGATKGGC	GTCGTMCGAT
Pocking	TCTGATCGAA	GGAAGGTCTC	GTTTAATTAT	GAGATCGTTC	GACGATKGGC	GTCGTMCGAT
Polen	TCTGATCGAA	GGARGGTCTC	GTTTAATTAT	GAGATCGTTC	GACGATKGGC	GTCGTMCGAT
Niedernbe	TCTGATCGAA	GGAAGGTCTC	GTTTAATTAT	GAGATCGTTC	GACGATKGGC	GTCGTMCGAT
Oderbruch	TCTGATCGAA	GGAAGGTCTC	GTTTAATTAT	GAGATCGTTC	GACGATKGGC	GTCGTMCGAT
Tier1_Oderb	TCTGATCGAA	GGAAGGTCTC	GTTTAATTAT	GAGATCGTTC	GACGATKGGC	GTCGTACGAT
Tier2_Oderb	TCTGATCGAA	GGAAGGTCTC	GTTTAATTAT	GAGATCGTTC	GACGATKGGC	GTCGTACGAT
Goettingen	TCTGATCGAA	GGAAGGKCTC	GTTTAATTAT	GAGATCGTTC	GACGATKGGC	GTCGTMCGAT
Bonn	TCTGATCGAA	GGAGGTCTC	GTTTAATTAT	GAGATCGTTC	GACGATKGGC	GTCGTMCGAT
Lintel	TCTGATCGAA	GGAAGGTCTC	GTTTAATTAT	GAGATCGTTC	GACGATKGGC	GTCGTMCGAT

 305 315 325 335 345 355
Bodensee	ATTCTACGTG	TACAGATTGA	AAATCCGCGA	TCTCAGTAGT	TTTCGTACGT	TCGTA AAAATG
Freiburg	ATTCTACGTG	TACAGATTGA	AAATCCGCGA	TCTCAGTAGT	TTTCGTACGT	TCGTA AAAATG
Frankreich	ATTCTACGTG	TACAGATTGA	AAATCCGCGA	TCTCAGTAGT	TTTCGTACGT	TCGTA AAAATG
Hess. Ried	ATTCTACGTG	TACAGATTGA	AAATCCGCGA	TCTCAGTAGT	TTTCGTACGT	TCGTA AAAATG
Karlsruhe	ATTCTACGTG	TACAGATTGA	AAATCCGCGA	TCTCAGTAGT	TTTCGTACGT	TCGTA AAAATG
Pocking	ATTCTACGTG	TACAGATTGA	AAATCCGCGA	TCTCAGTAGT	TTTCGTACGT	TCGTA AAAATG
Polen	ATTCTACGTG	TACAGATTGA	AAATCCGCGA	TCTCAGTAGT	TTTCGTACGT	TCGTA AAAATG
Niedernberg	ATTCTACGTG	TACAGATTGA	AAATCCGCGA	TCTCAGTAGT	TTTCGTACGT	TCGTA AAAATG
Oderbruch	ATTCTACGTG	TACAGATTGA	AAATCCGCGA	TCTCAGTAGT	TTTCGTACGT	TCGTA AAAATG
Tier1_Oderb	ATTCTACGTG	TACAGATTGA	AAATCCGCGA	TCTCAGTAGT	TTTCGTACGT	TCGTA AAAATG
Tier2_Oderb	ATTCTACGTG	TACAGATTGA	AAATCCGCGA	TCTCAGTAGT	TTTCGTACGT	TCGTA AAAATG
Goettingen	ATTCTACGTG	TACAGATTGA	AAATCCGCGA	YCTCAGTAGT	TTTCGTACGT	TCGTA AAAATG
Bonn	ATTCTACGTG	TACAGATKGA	AAATCCGCGA	YCTCAGTAGT	TTTCGTACGT	YSGTA AAAATG
Lintel	ATTCTACGTG	TACAGATTGA	AAATCCGCGA	TCTCAGTAGT	TTTCGTACGT	TCGTA AAAATG

Anhang

	365	375	385	395	405	415
Bodensee	ACAAATTCAT	GCGGTTGAAA	ATTGTATATT	TTTCAGACAT	TTATAAAAATT	ATTATTATTA
Freiburg	ACAAATTCAT	GCGGTTGAAA	ATTGTATATT	TTTCAGACAT	TTATAAAAATT	ATTATTATTA
Frankreich	ACAAATTCAT	GCGGTTGAAA	ATTGTATATT	TTTCAGACAT	TTATAAAAATT	ATTATTATTA
Hess. Ried	ACAAATTCAT	GCGGTTGAAA	ATTGTATATT	TTTCAGACAT	TTATAAAAATT	ATTATTATTA
Karlsruhe	ACAAATTCAT	GCGGTTGAAA	ATTGTATATT	TTTCAGACAT	TTATAAAAATT	ATTATTATTA
Pocking	ACAAATTCAT	GCGGTTGAAA	ATTGTATATT	TTTCANACAT	TTATAAAAATT	ATTATTATTA
Polen	ACAAATTCAT	GCGGTTGAAA	ATTGTATATT	TTTCAGACAT	TTATAAAAATT	ATTATTATTA
Niedernberg	ACAAATTCAT	GCGGTTGAAA	ATTGTATATT	TTTCAGACAT	TTATAAAAATT	ATTATTATTA
Oderbruch	ACAAATTCAT	GCGGTTGAAA	ATTGTATATT	TTTCAGACAT	TTATAAAAATT	ATTATTATTA
Tier1_Oderb	ACAAATTCAT	GCGGTTGAAA	ATTGTATATT	TTTCAGACAT	TTATAAAAATT	ATTATTATTA
Tier2_Oderb	ACAAATTCAT	GCGGTTGAAA	ATTGTATATT	TTTCAGACAT	TTATAAAAATT	ATTATTATTA
Goettingen	ACAAATTCAT	GCGGTTGAAA	ATTGTATATT	TTTCAGACAT	TTATAAAAATT	ATTATTATTA
Bonn	ACAAATTCAT	CCGGTKGAAA	ATTGTATATT	TT-----	-----	-----
Lintel	ACAAATTCAT	CCGGTKGAAA	ATTGTATATT	TTTCAGACAT	TTATAAAAATT	ATTATTATTA

	425	435	445	455
Bodensee	TTGTTTATTT	ATAACC----	-----	-----
Freiburg	TTGTTTATTT	ATAACCACTA	TAAACCATTA	CCCTGGACGG
Frankreich	TTGTTTATTT	ATAACCACTA	TAAACCATTA	CCCTGGACGG
Hess. Ried	TTGTTTATTA	ATAACCACTA	TAAACCATTA	CCCTGGACGG
Karlsruhe	TTGTTTATTT	ATAACCACTA	TAAACCATTA	CCCTGG----
Pocking	TTGTTTATTT	ATAACCACTA	T-----	-----
Polen	TTGTTTATTT	ATAACCACTA	TAAACCATTA	CC-----
Niedernberg	TTGTTTATTT	ATAACCACTA	TAAACCATTA	CCCTGGACGG
Oderbruch	TTGTTTATTT	ATAA-----	-----	-----
Tier1_Oderb	TTGTTTATTT	ATAACCACTA	TAAACCATTA	CCCTGGACGG
Tier2_Oderb	TTGTTTATTT	ATAACCACTA	TAAACCATTA	CCCTGGACGG
Goettingen	TTGTTTATTT	ATAACC----	-----	-----
Bonn	-----	-----	-----	-----
Lintel	TTGTTTATTT	ATAA-----	-----	-----



Goettingen, Bonn und Lintel = E-Rasse; alle anderen Populationen = Z-Rasse
 Grüne Markierung: Unterschiede zwischen MARCO et al. (1999) und LIEBE (2004)
 Rote Markierung: Unterschiede zwischen der E- und Z-Rasse

5. T-RFLP-Originalläufe von *O. nubilalis* von verschiedenen Standorten mit jeweils eine Wiederholung von Oderbruch und Halle

Größe [bp]	Niedernberg	Bonn	Oderbruch_1	Oderbruch_2	Halle_1	Halle_2	H. Ried	Pocking	Freiburg	Karlsruhe
50			33		27					
51	1884	1249	896	642	1514	260	1452	1539	696	1394
68	80				55			40	27	49
69,2	204	50	97	82	181	35	140	171	86	159
70,5	269	71	111	88	228	43	194	204	109	161
71,1	160	25	60	63	150		101	139	58	103
72,2						82				
287							25			
291								46		
331	46				35		26	30		
331,5	60				42			36		
333	44							36		
379		80					31			34
380										33
381,2	6026	1691	2261	1973	4157	734	3126	4632	2056	2976
397,5	3558	990	1453	1080	2315	423	1776	2418	1188	1719
400,4	77		41	27	61		36	54	26	43
402	39				26					
403,5	84	28	354	495	55	63		33		36
404	87	205			62	85		46		45
404,5										44
406,6	181	89	99	69	124	31	107	164	70	87
Summe	12.799	4.478	5.405	4.519	9.032	1.756	7.014	9.588	4.316	6.883

6. Primerauswertung über drei Jahre

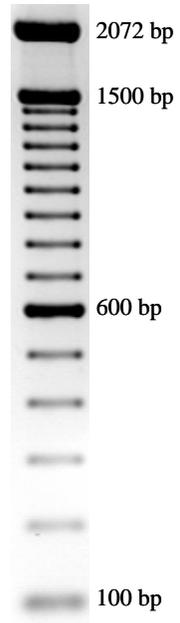
	1999		2000		2001		1999 - 2001		1999 - 2001 Fragmentgröße	
	Gesamt_B	poly in %	Gesamt_B	poly in %	Gesamt_B	poly in %	MW poly	± SD		
Roth A 18	3	100,0	4	25,0	3	33,3	52,8	41,1	stark monomorpher Primer	910-1500
Roth A 12	6	50,0	6	50,0	9	66,7	55,6	9,6		600-1900
Roth A 02	7	100,0	8	50,0	9	44,4	64,8	30,6		520-1300
Roth A 11	11	36,4	12	100,0	11	81,8	72,7	32,8		550-1800
OPB-01	12	91,7	14	71,4	7	57,1	73,4	17,3		300-1700
OPA-07	12	83,3	9	66,7	12	75,0	75,0	8,3		200-1700
Roth A 180	6	83,3	11	63,6	11	81,8	76,3	11,0		400-1900
OPB-08	11	90,9	8	75,0	9	66,7	77,5	12,3		400-2072
OPD-11	11	100,0	10	80,0	7	57,1	79,0	21,4		380-1900
Roth A 03	10	100,0	6	66,7	7	71,4	79,4	18,0		490-1800
Roth A 19	5	100,0	10	70,0	13	76,9	82,3	15,7		400-1900
Roth A 16	9	88,9	15	86,7	14	78,6	84,7	5,4		590-1700
Roth A 280	9	100,0	5	80,0	8	75,0	85,0	13,2		370-1100-2072
OPC-15	13	100,0	14	71,4	12	91,7	87,7	14,7		300-2072
OPA-05	8	100,0	13	76,9	9	88,9	88,6	11,5		600-1500
Roth A 09	10	90,0	7	85,7	7	100,0	91,9	7,3		400-1800
OPC-18	2	100,0	5	100,0	6	83,3	94,4	9,6		450-1500
Roth A 10	7	100,0	10	90,0	10	100,0	96,7	5,8		750-1500
OPF-03	8	100,0	14	92,9	9	100,0	97,6	4,1		300-1600
Roth A 20	5	100,0	6	100,0	12	100,0	100,0	0,0	stark polymorpher Primer	750-2072

Gesamt_B = Gesamtbanden; poly = polymorphe Banden; MW = Mittelwert; SD = Standardabweichung

Primer	1999			2000			2001		
	Gesamt_B	mono	poly	Gesamt_B	mono	poly	Gesamt_B	mono	poly
OPA-05	8	0	8	13	3	10	9	1	8
OPA-07	12	2	10	9	3	6	12	3	9
OPB-01	12	1	11	14	4	10	7	3	4
OPB-08	11	1	10	8	2	6	9	3	6
OPC-15	13	0	13	14	0	14	12	1	11
OPC-18	2	0	2	5	0	5	6	1	5
OPD-11	11	0	11	10	2	8	7	3	4
OPF-03	8	0	8	14	1	13	9	0	9
Roth 180-08	6	1	5	11	4	7	11	2	9
Roth 280-08	9	0	9	5	1	4	8	2	6
Roth-02	7	0	7	8	4	4	9	5	4
Roth-03	10	0	10	6	2	4	7	2	5
Roth-09	10	1	9	7	1	6	7	0	7
Roth-10	7	0	7	10	0	10	10	0	10
Roth-11	11	4	7	12	1	11	11	2	9
Roth-12	6	3	3	6	3	3	9	3	6
Roth-16	9	1	8	15	2	13	14	3	11
Roth-18	3	0	3	5	3	2	3	2	1
Roth-19	5	0	5	10	3	7	13	3	10
Roth-20	5	0	5	6	0	6	12	0	12

Gesamt_B = Gesamtbanden; mono = monomorphe Banden; poly = polymorphe Banden

7. RAPD-PCR-Gele von *O. nubilalis* aus den Jahren 1999, 2000 und 2001 mit den jeweiligen Lokalpopulationen und den zwei Außengruppen *Ephestia kuehniella* und *Plodia interpunctella*

Abkürzung	Beschreibung	100 bp-Marker
B	Bodensee (<i>O. nubilalis</i>)	
Bn, Bn 99	Bonn 2001, Bonn 1999	
E	<i>Ephestia kuehniella</i>	
F	Freiburg (<i>O. nubilalis</i>)	
H	Halle (<i>O. nubilalis</i>)	
H ₂ O	Wasser (Kontrollprobe)	
HR	Hessisches Ried (<i>O. nubilalis</i>)	
K	Karlsruhe (<i>O. nubilalis</i>)	
M	100 bp-Marker	
N	Niedernberg (<i>O. nubilalis</i>)	
O, O´	Oderbruch, 2. Oderbruch-Probe (<i>O. nubilalis</i>)	
P	Pocking (<i>O. nubilalis</i>)	
Pl	<i>Plodia interpunctella</i>	

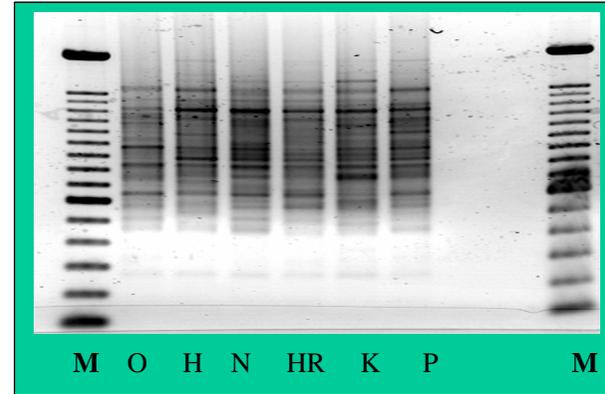
OPA-05

5' > AGG GGT CTT G < 3'

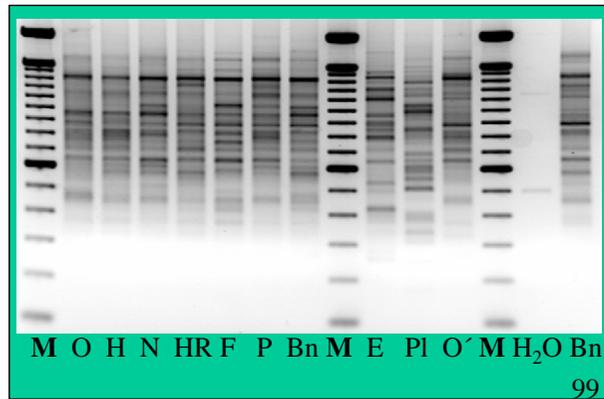
G/C-Gehalt 60 %

T_m 32°C

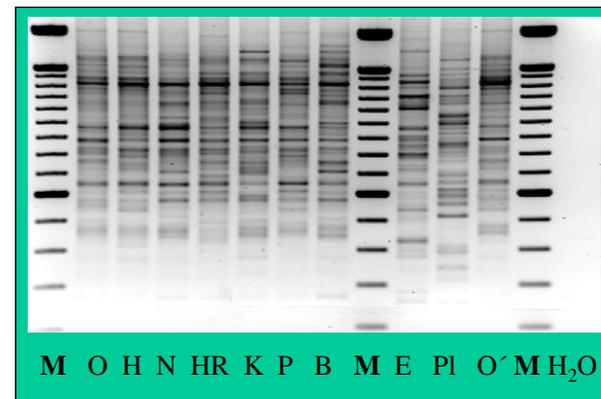
1999



2001



2000



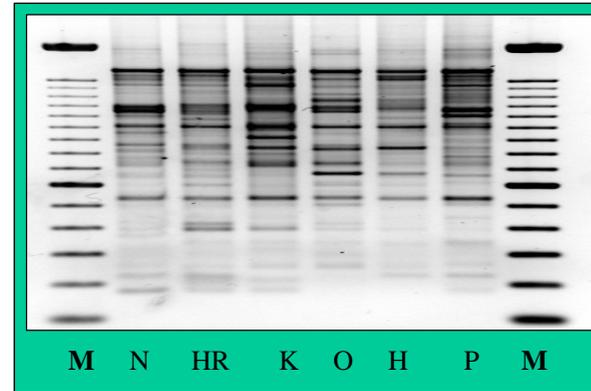
OPA-07

5' > GAA ACG GGT G < 3'

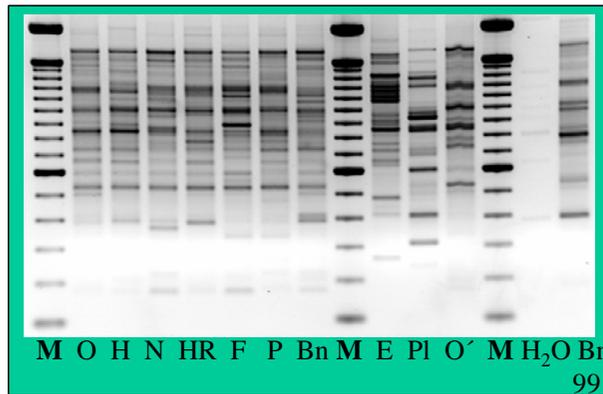
G/C-Gehalt 60 %

T_m 32°C

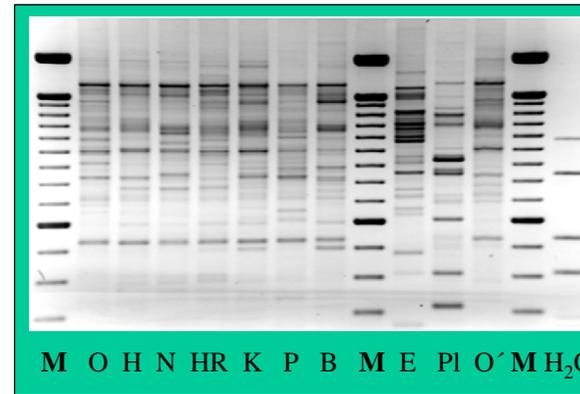
1999



2001



2000



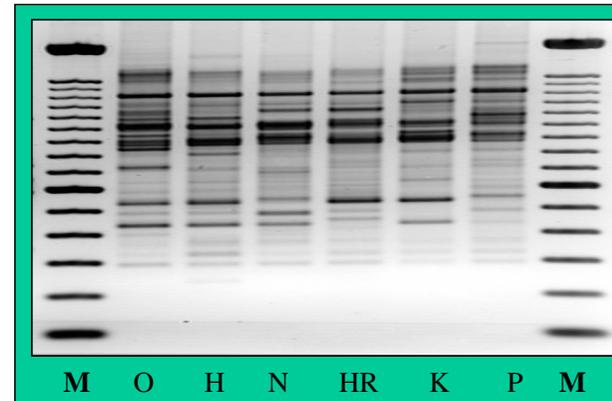
1999

OPB-01

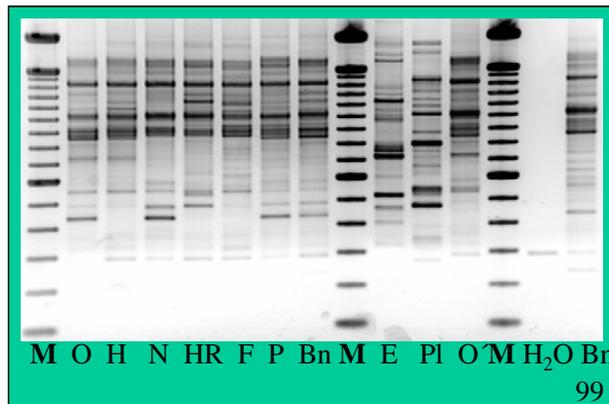
5' > GTT TCG CTC C < 3'

G/C-Gehalt 60 %

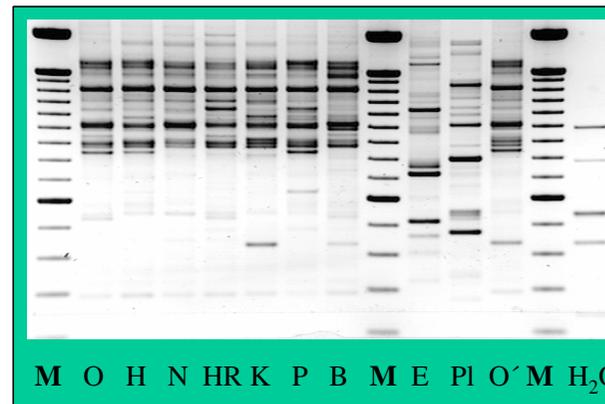
T_m 32°C



2001



2000



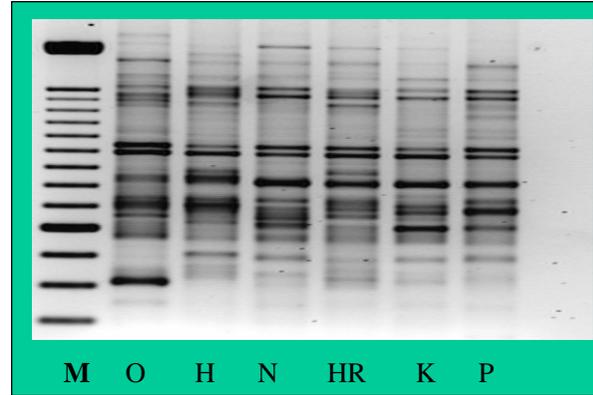
OPB-08

5' > GTC CAC ACG G < 3'

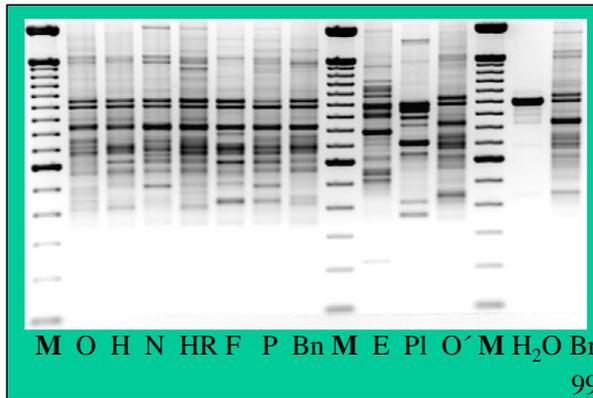
G/C-Gehalt /0 %

T_m 34°C

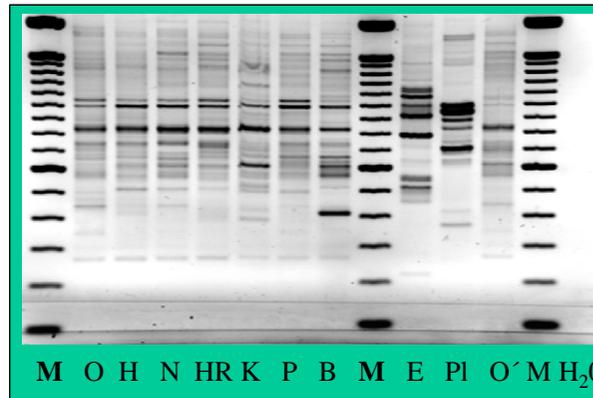
1999



2001



2000



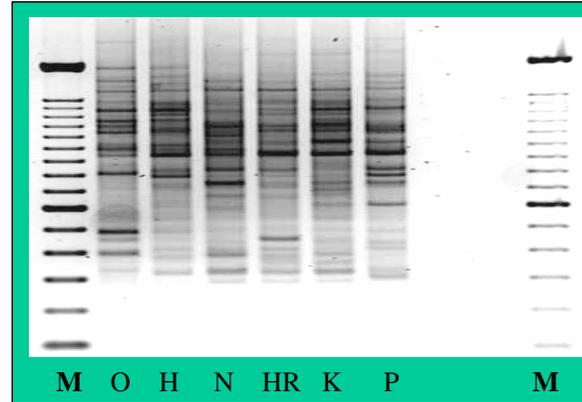
OPC-15

5' > GAC GGA TCA G < 3'

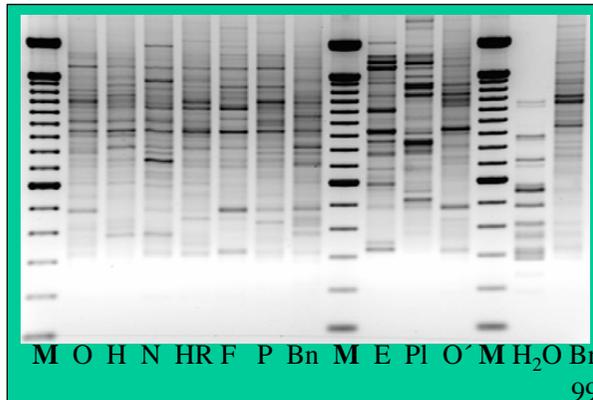
G/C-Gehalt 60 %

T_m 32°C

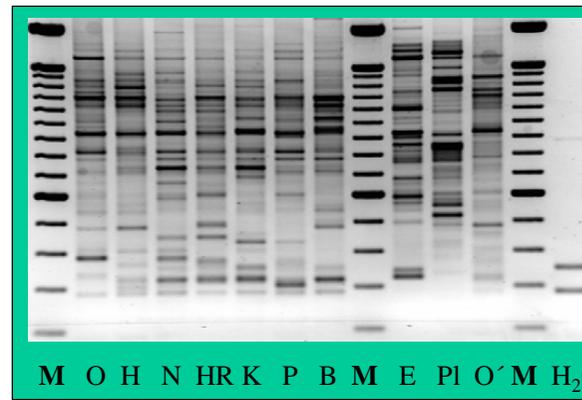
1999



2001



2000



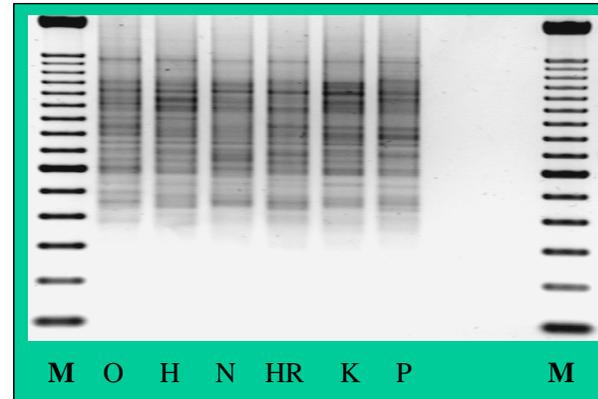
OPC-18

5' > TGA GTG GGT G < 3'

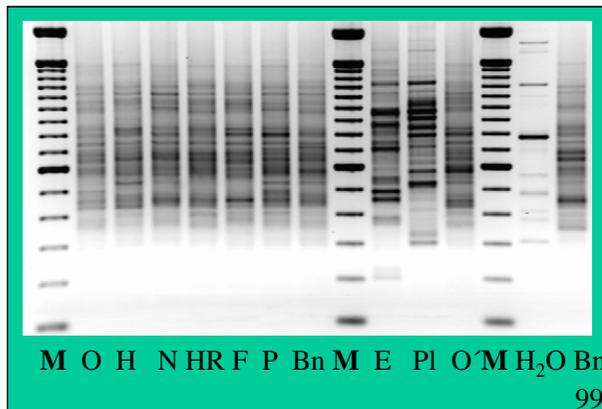
G/C-Gehalt 60 %

T_m 32°C

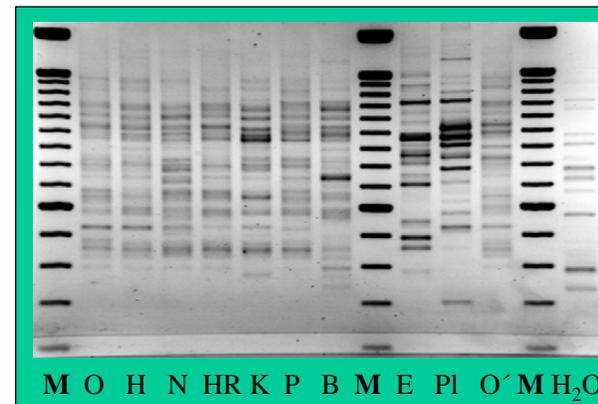
1999



2001



2000



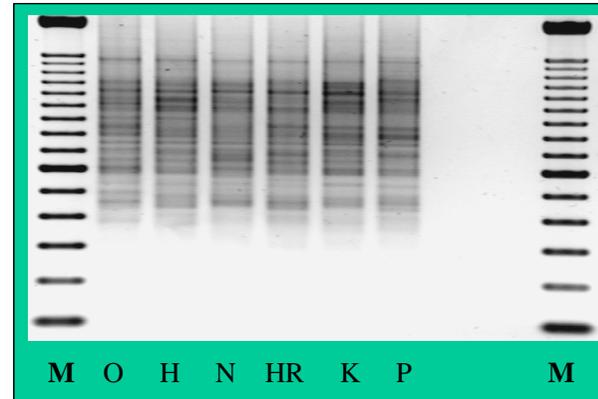
OPC-18

5' > TGA GTG GGT G < 3'

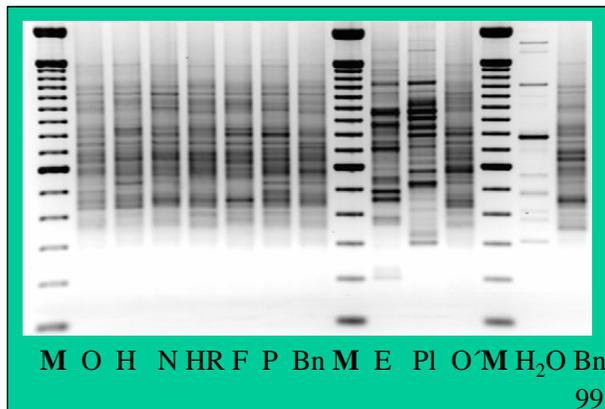
G/C-Gehalt 60 %

T_m 32°C

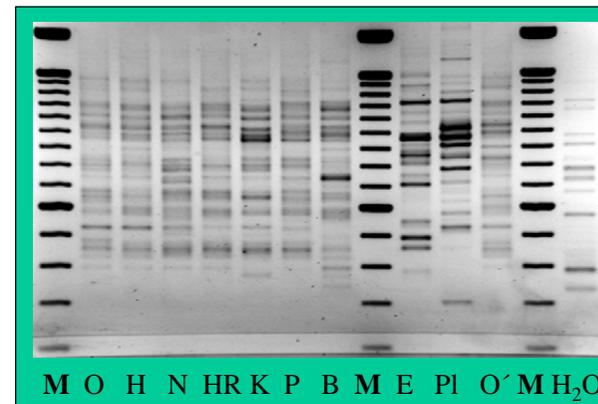
1999



2001



2000



OPD-11

5' > AGC GCC ATT G < 3'

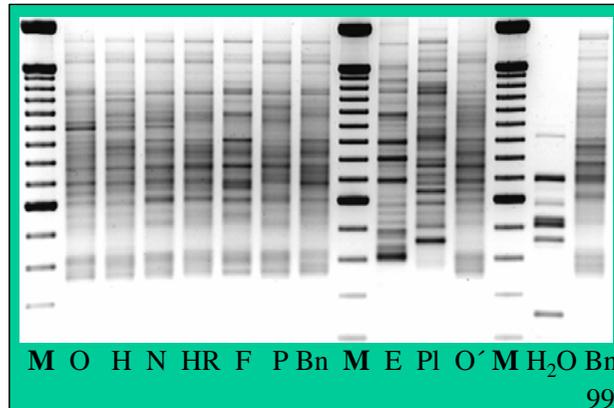
G/C-Gehalt 60 %

T_m 32°C

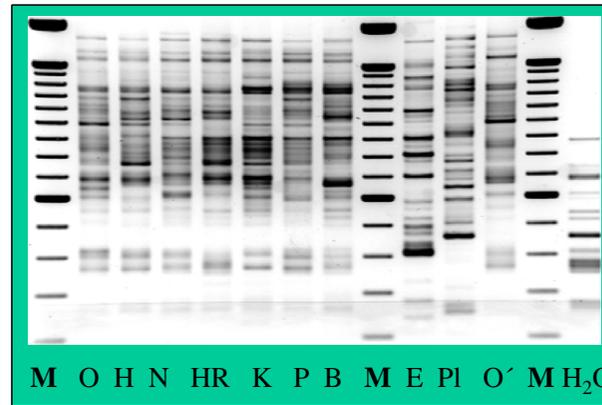
1999



2001



2000



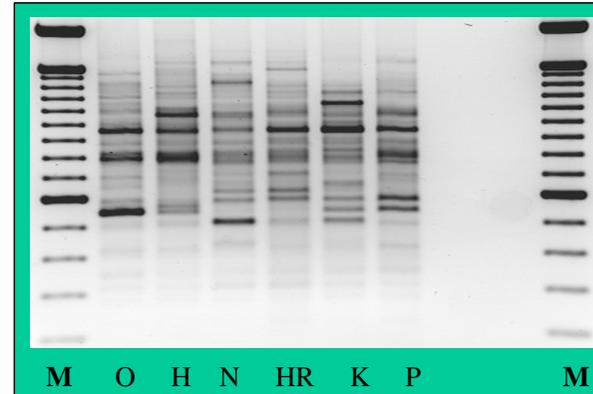
OPF-03

5' > CCT GAT CAC C < 3'

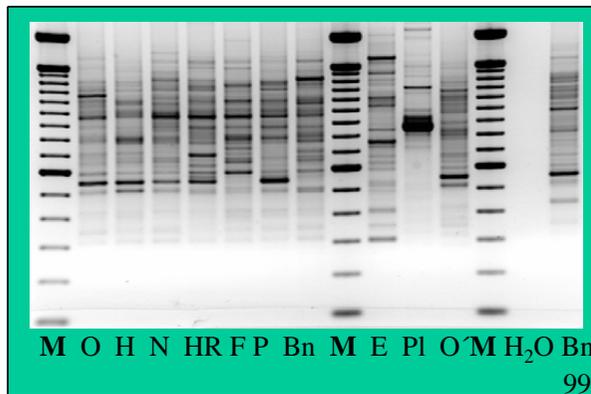
G/C-Gehalt 60 %

T_m 32°C

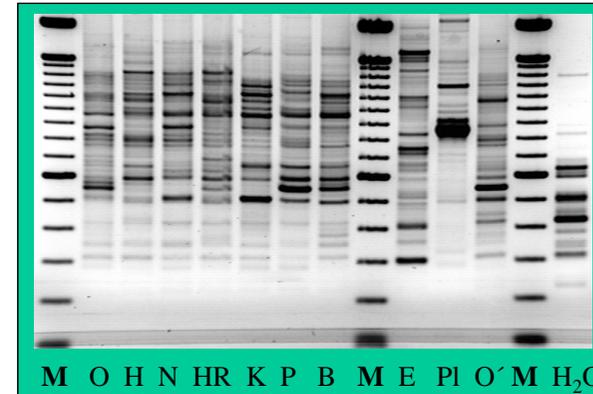
1999



2001



2000



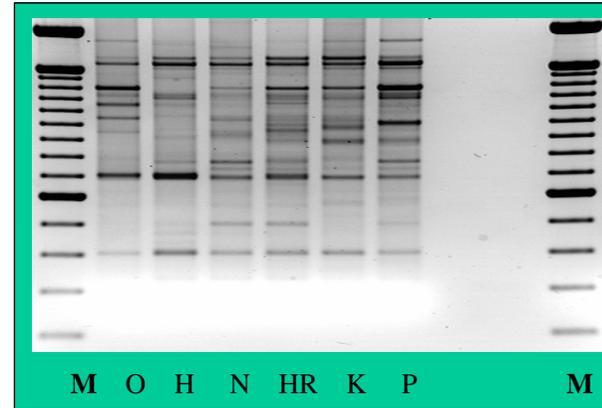
Roth 180-08

5' > CGC CCT CAG C < 3'

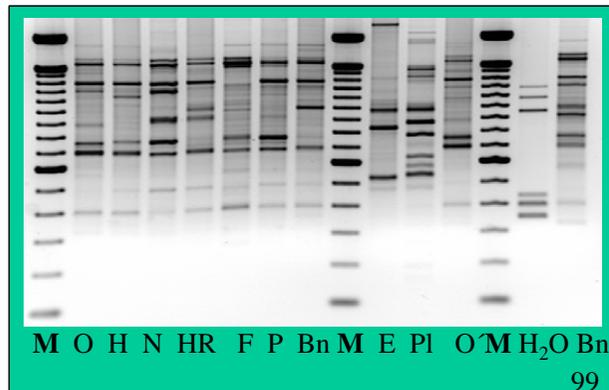
G/C-Gehalt 60 %

T_m 32°C

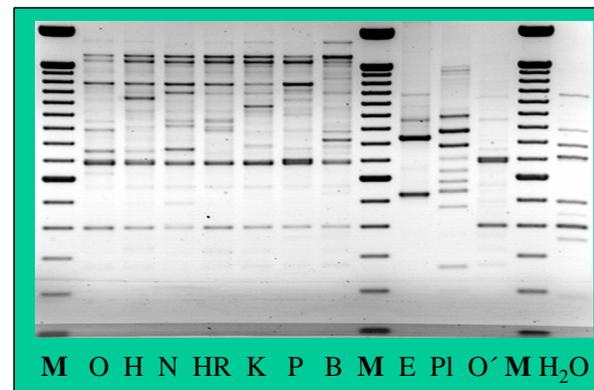
1999



2001



2000



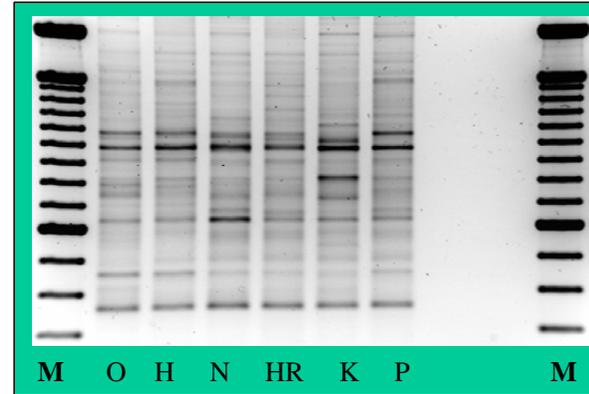
Roth 280-08

5' > GGC CAC AGC G < 3'

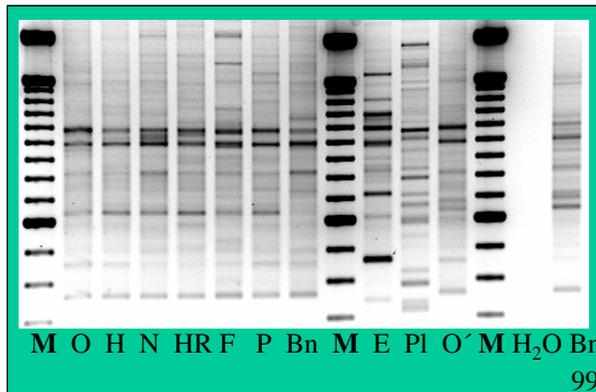
G/C-Gehalt 60 %

T_m 32°C

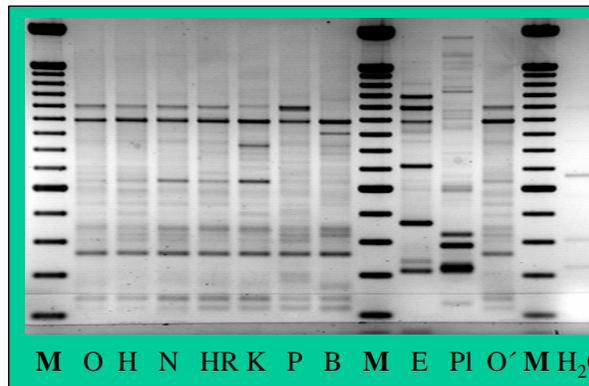
1999



2001



2000



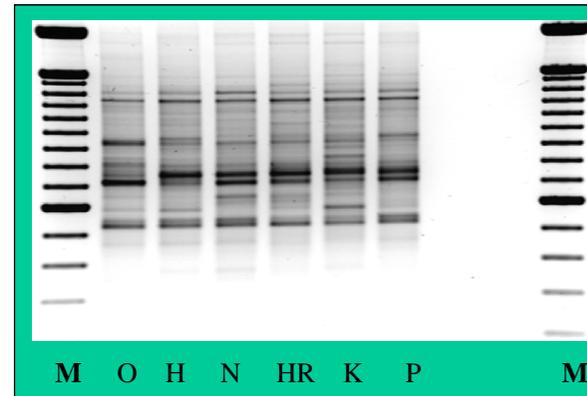
Roth-02

5' > TGC CGA GCT G < 3'

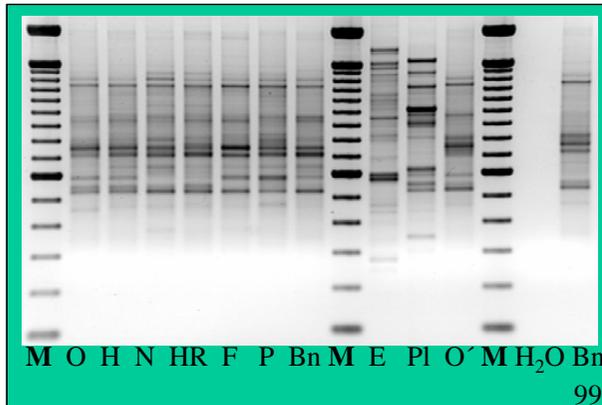
G/C-Gehalt 70 %

T_m 34°C

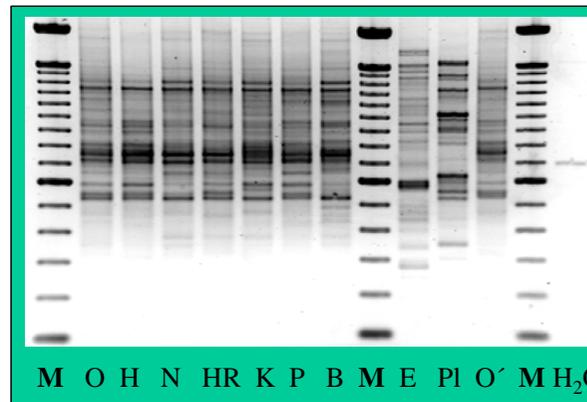
1999



2001



2000



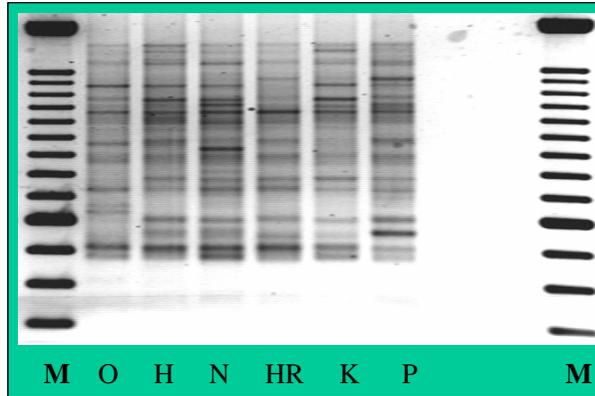
Roth-03

5' > AGT CAG CCA C < 3'

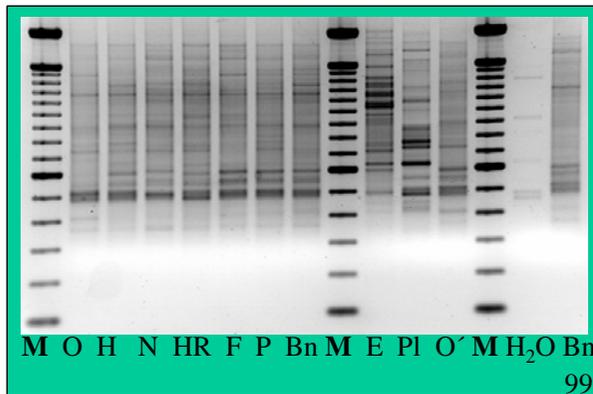
G/C-Gehalt 70 %

T_m 34°C

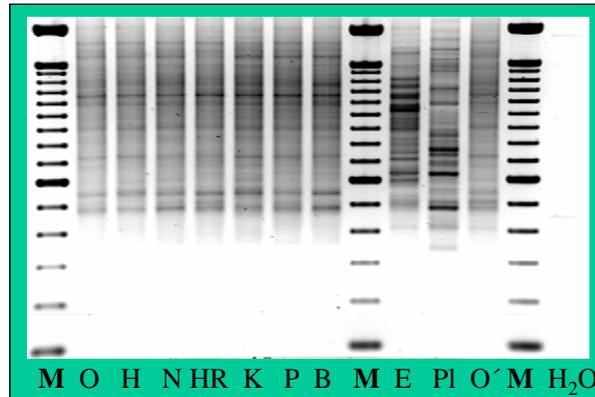
1999



2001



2000



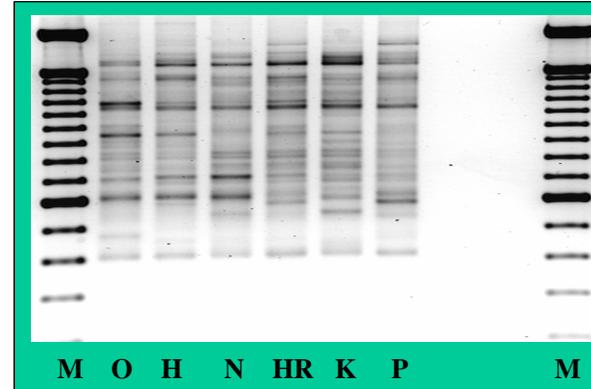
Roth-09

5' > GGG TAA CGC C < 3'

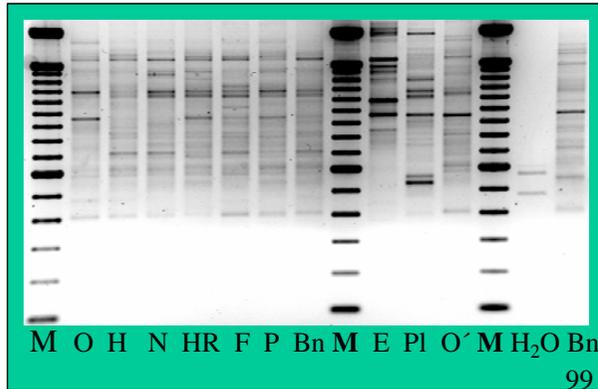
G/C-Gehalt 70 %

T_m 34°C

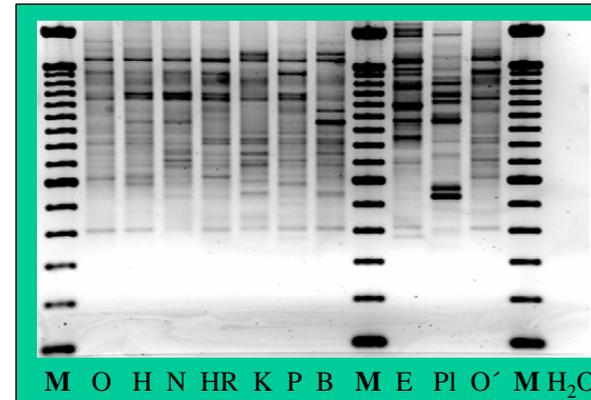
1999



2001



2000



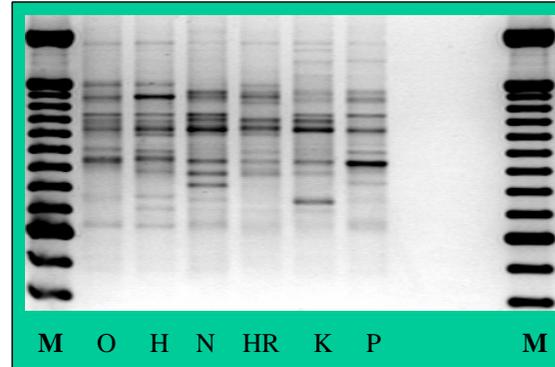
Roth-10

5' > GTG ATC GCA G < 3'

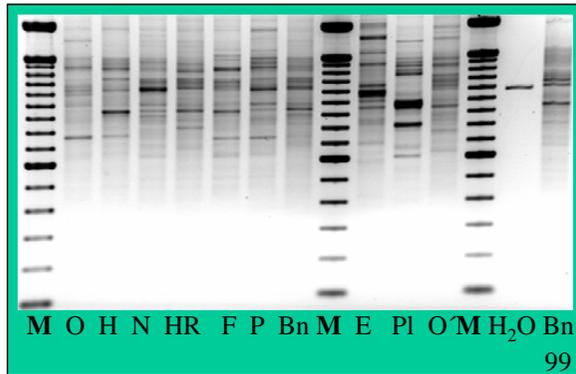
G/C-Gehalt 60 %

T_m 32°C

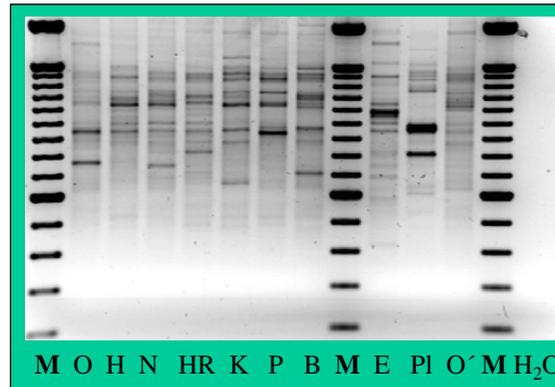
1999



2001



2000



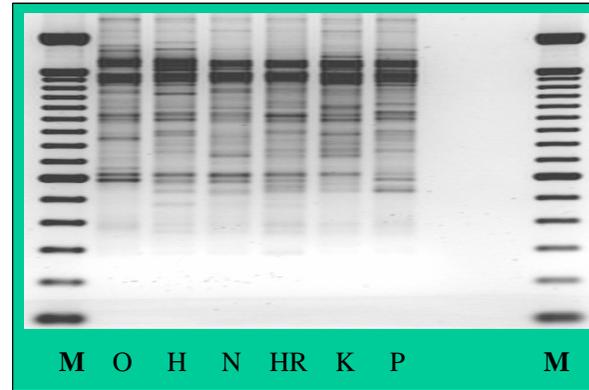
Roth-11

5' > CAA TCG CCG T < 3'

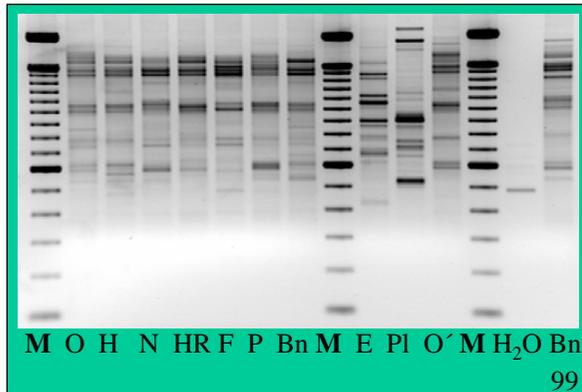
G/C-Gehalt 60 %

T_m 32°C

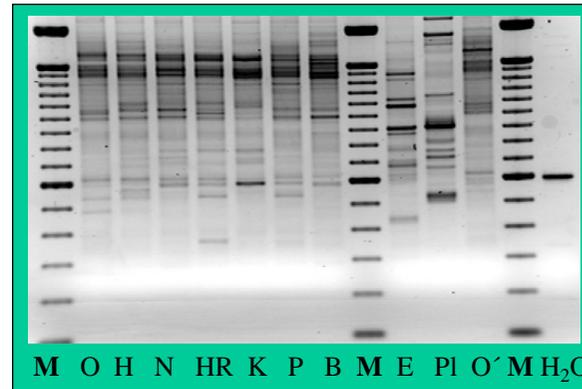
1999



2001



2000



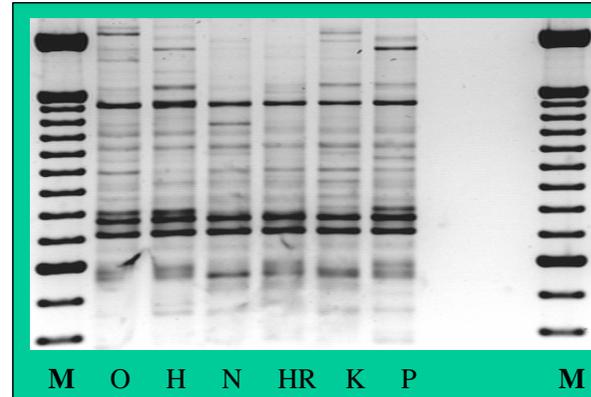
Roth-12

5' > TCG GCG ATA G < 3'

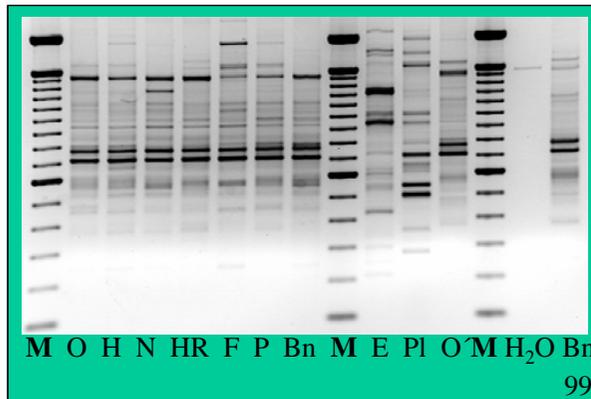
G/C-Gehalt 60 %

T_m 32°C

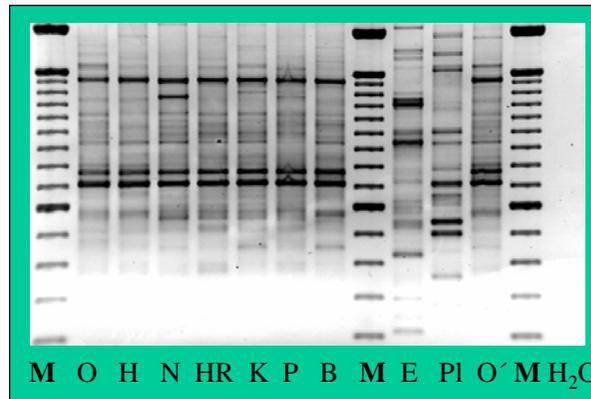
1999



2001



2000



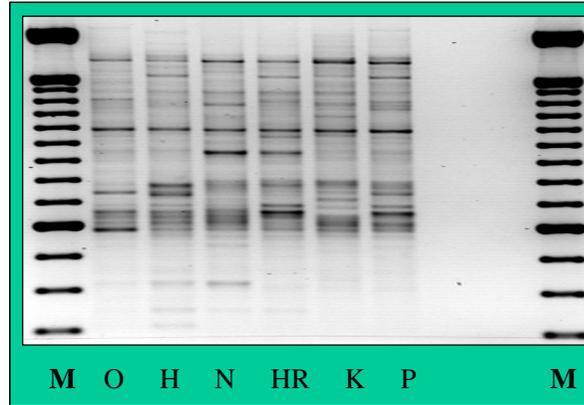
Roth-16

5' > AGC CAG CGA A < 3'

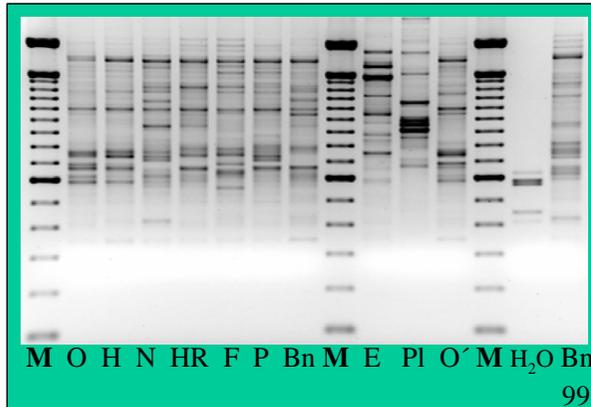
G/C-Gehalt 60 %

T_m 32°C

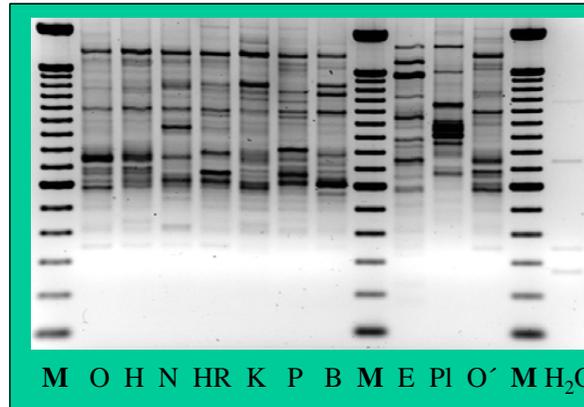
1999



2001



2000



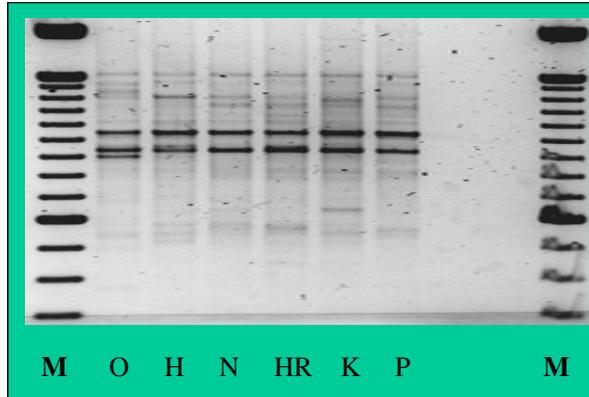
Roth-18

5' > AGG TGA CCG T < 3'

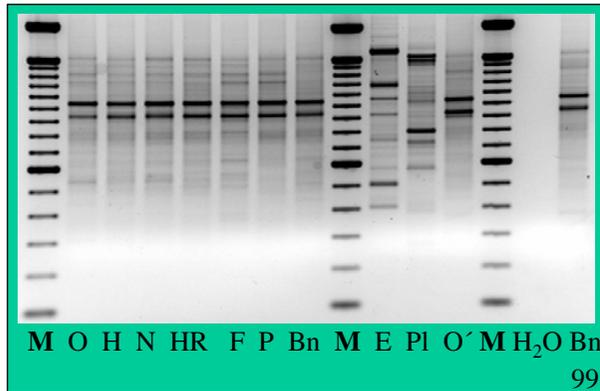
G/C-Gehalt 60 %

T_m 32°C

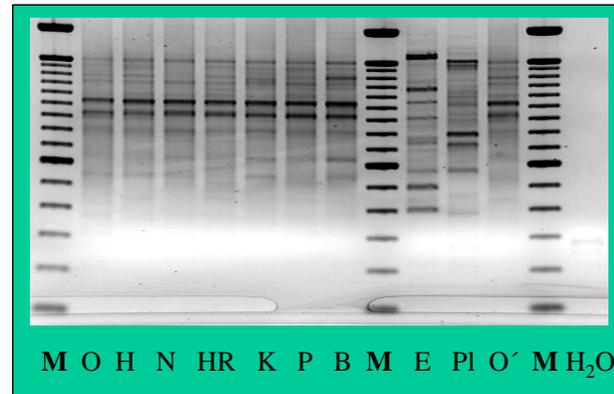
1999



2001



2000



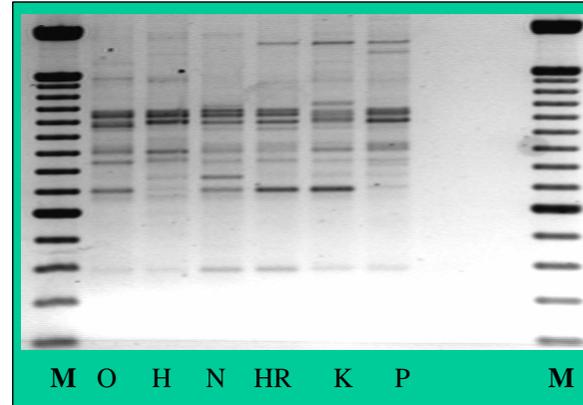
Roth-19

5' > CAA ACG TCG G < 3'

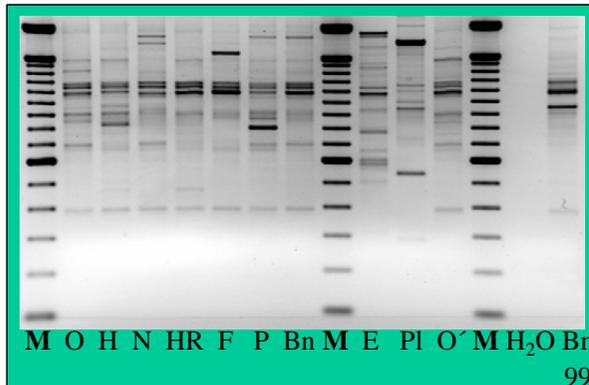
G/C-Gehalt 60 %

T_m 32°C

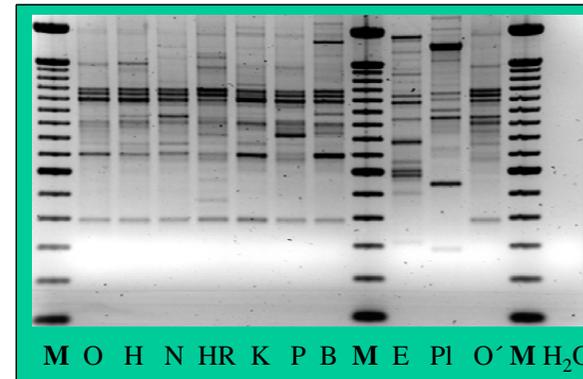
1999



2001



2000



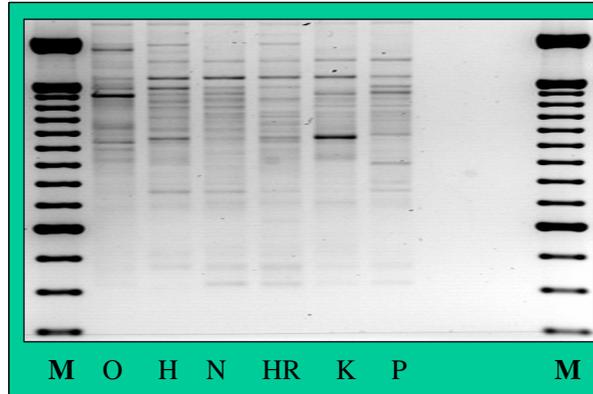
Roth-20

5' > **GTT GCG ATC C** < 3'

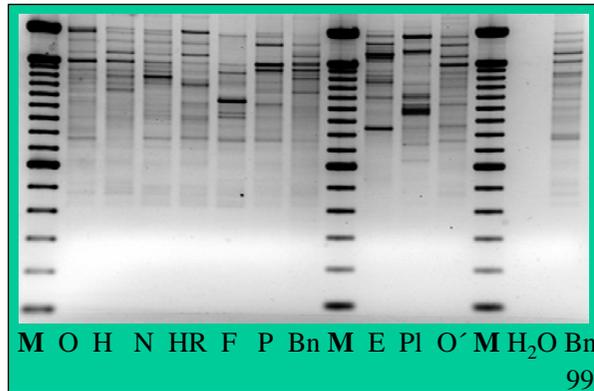
G/C-Gehalt 60 %

T_m 32°C

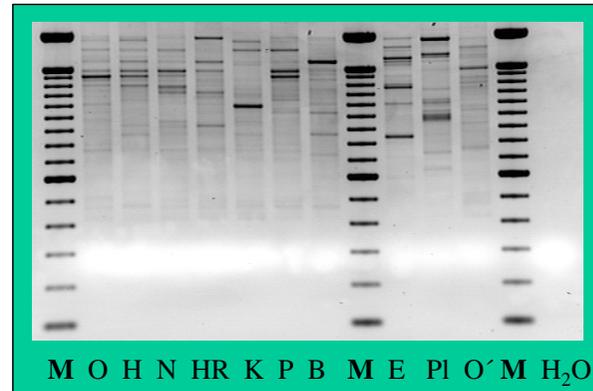
1999

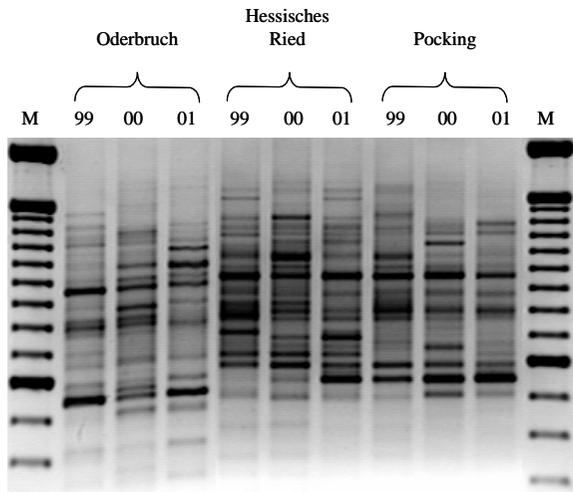


2001

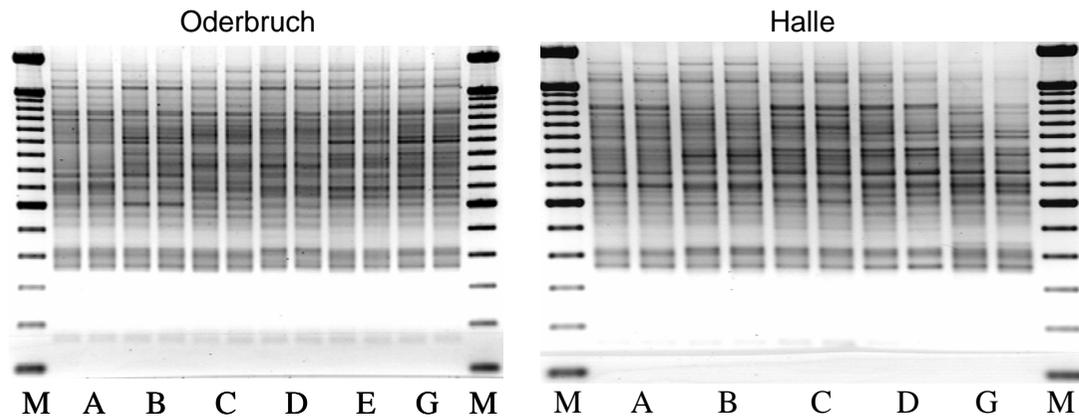


2000





Standorte Oderbruch, Halle und Pocking mit jeweils drei Wiederholungen mit dem Primer OPF-03



Feldvergleich Oderbruch und Halle mit Primer OPD-11

8. Urtabellen sind an der BBA bei Herrn Dr. B. HOMMEL (IP) einsichtbar.

(Dateiname)	Beschreibung
(a)	F-Statistik der Einzeltiere
(b)	H_S , H_T , F_{ST} der Einzeltiere
(c)	F-Statistik von Geschwistern
(d)	F-Statistik von den Stängeln und Vergleich mit Feld
(e)	F-Statistik von Teilfeldern
(f)	F-Statistik von Gesamtfeldern und allen Teilfeldern
(g)	0/1-Tab. aus den Jahren 2000 und 2001 mit zwei Außengruppen
(h)	0/1-Tab. von 40er-Gruppe (Auswertung 1 & 2)
(i)	0/1-Tab. aus den Jahren 1999, 2000, 2001 (Auswertung 1 & 2)
(j)	0/1-Tab. von 5 Standorten aus 3 Jahren (Auswertung 1 & 2)
(k)	Tab. der Bandenhäufigkeiten von drei Jahren
(l)	0/1-Tab. von 3 Standorten mit jeweils drei Wiederholungen
(m)	F-Statistik der Tiergruppen
(n)	H_S , H_T , F_{ST} der Tiergruppen
(o)	0/1-Tab. von 6 Standorten aus 2 Jahren
(p)	Manteltest

DANKSAGUNG

Der Umfang und die Vielfalt dieser Arbeit wären ohne allseitige Unterstützungen nicht möglich gewesen. Mein besonderer Dank gilt:

BBA-Kleinmachnow

Herrn Dr. B. Hommel für seine intensive Betreuung der Arbeit. Er trug durch seine Erfahrungen, sein Wissen und die belebenden und anregenden Diskussionen wesentlich zur inhaltlichen Bereicherung und Gestaltung der Arbeit bei.

Herrn Prof. Dr. U. Burth für die Betreuung der Arbeit und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Frau A. Metke für die Einführung in die Labortätigkeit.

Herrn B. Golla für die Bereitstellung des GPS-Gerätes und für die Einweisung in deren Benutzung.

Herrn Dr. S. Enzian für die Bereitstellung der Daten über den derzeitigen Maisanbau in Deutschland.

Herrn Dr. B. Freier für die Bewältigung von fachlichen Hürden und die Abnahme der mündlichen Prüfung.

Frau B. Höntze für die Unterstützung bei der Betreuung der Zuchten und für die Durchführung der Biotests, auch wenn diese nicht unmittelbar Bestandteil der vorliegenden Dissertation sind.

Justus-Liebig-Universität Gießen

Frau Prof. Dr. T. Trenczek für die fachliche Begleitung der Arbeit, den gewährten Freiraum bei der Durchführung der Untersuchungen und die Übernahme des Erstgutachtens.

BBA-Braunschweig

Herrn Dr. W. Burgermeister für die theoretischen und praktischen Hinweise zur PCR. In mehreren Diskussionsrunden konnten Ideen weiter ausgebaut und Ergebnisse besser analysiert werden. Auch für die

Danksagung

kritische Durchsicht des Manuskripts sei ihm an dieser Stelle Dank gesagt.

Frau E. Buchbach für die Einführung in die Labortätigkeit und die vielen praktischen Tipps beim Arbeiten im Labor.

Herrn Prof. Dr. H. Backhaus für die Übernahme der TGGE-Betreuung und die Abnahme der mündlichen Prüfung. Mit seiner Hilfe gelang die schnelle Einarbeitung und erfolgreiche Durchführung in den interessanten Themenkomplex der TGGE.

Frau P. Mitsche für die kompetente und freundliche Unterstützung bei der praktischen Durchführung der TGGE.

BBA-Darmstadt

Herr Dr. Langenbruch für die fachlichen Ratschläge der Biologie des Maiszünslers, die nicht nur für die Zuchten, sondern auch für die Bewertung der PCR-Ergebnisse von Vorteil waren.

Frau Dr. R. Kleespies für die Übernahme der Prüfung auf Mikrosporidienbefall bei den Maiszünslern aus dem Oderbruch.

Herrn Dr. T. Meise danke ich für die gute und freundliche Zusammenarbeit, die Bereitstellung der Larven aus dem Hessischen Ried, Niedernberg und Pocking und besonders für die vielen zum Teil anregenden Diskussionen.

ZALF-Institut

Herrn Dr. A. Ulrich für die Unterstützung und Durchführung der T-RFLP. Durch seine langjährigen Erfahrungen in diesen Bereich konnte eine sichere Analyse der Mikroorganismen durchgeführt werden. Bei allen Technischen Assistenten möchte ich mich für die praktische Unterstützung bedanken.

Universität Magdeburg

Herrn Dr. Kropf für die Durchführung des Permutationstestes.

Danksagung

Congen GmbH

Herrn Dr. S. Mergemeier für die Einführung in die Sequenzierung und besonders für die schwierige Auswertung der vielen Sequenzdaten.
Allen Technischen Assistenten danke ich für die praktische Hilfe im Labor.

Max-Planck-Institut

Herrn Prof. Dr. A. Heyer für die Bereitstellung des Programms Genetics Computer Group zur Suche nach geeigneten Restriktionsenzymen.

RWTH Aachen

Herrn Dr. Detlef Bartsch für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der
Frau C. Saeglitz Larven aus dem südlichen Teil Deutschlands.

Maiszünsler-Proben aus aus Polen und Frankreich

Herrn Dr. F. Lisowicz für die Sammlung der Maiszünsler-Larven in Polen.

Herrn R. Grogna (Monsanto) für die Sammlung der Maiszünsler-Larven in Frankreich.

BMBF

für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit im Rahmen des BMBF-Förderprogramms „BioMonitor“.

Familie

Bei meiner gesamten Familie möchte ich mich für die moralische Unterstützung bedanken. Diese brauchte ich besonders nach der Geburt meiner kleinen Tochter und der noch nicht vollendeten Dissertation.