

Die Rolle von Faeces und simuliertem Regen bei der
Übertragung der Mikrosporidien *Nosema lymantriae* und
Endoreticulatus schubergi bei *Lymantria dispar*

Masterarbeit

Carina Steyer

Universität für Bodenkultur Wien
Department für Wald- und Bodenwissenschaften
Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz

Betreuer:
Univ. Ass. Dipl.-Ing. Dr. Gernot Hoch
Univ. Prof. Dr. Axel Schopf

Wien, Februar 2010

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Axel Schopf für die Betreuung meiner Masterarbeit sowie die Anmerkungen an meinem Manuskript.

Mein besonderer Dank gilt Univ. Ass. Dipl.-Ing. Dr. Gernot Hoch für die überaus engagierte Betreuung. Die vielen wertvollen Ratschläge haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Des weiteren möchte ich mich bei Dr. Dörte Goertz für die vielen hilfreichen Tipps während der praktischen Durchführung der Arbeit bedanken.

Andrea Stradner und Dipl.-Ing. Peter Kritsch danke ich für die Unterstützung bei der Raupenzucht und dem Kochen des Futters.

Meinem Mann René danke ich für die immerwährende Hilfsbereitschaft und die aufgebrachte Geduld.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, die mir durch ihre großzügige Unterstützung mein Studium und die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Abstract

The present study aimed at experimentally confirming horizontal transmission of the microsporidia *Nosema lymantriae* and *Endoreticulatus schubergi* through feces of infected *Lymantria dispar* larvae that were fed with oak foliage. Furthermore, the effects of simulated rain and varying density of inoculated larvae on transmission were examined. Therefore, oak foliage was either contaminated by presence and feces of inoculated larvae (16 days after oral administration of 1×10^3 spores per larvae) or their feces alone. Additionally, light rain was simulated in a part of the cylinders using a watering can. Contamination by spore containing feces alone was sufficient to transmit the infection with *N. lymantriae* to 4.4 ± 7.3 % of exposed larvae. The simulation of light rain led to a significant increase of the infection rate to 30.0 ± 24.5 %. Presence of inoculated larvae in the cylinder led to an even higher transmission (infection rate 68.9 ± 35.2 %). In a second experiment, contamination occurred through the presence and the feces of one, three, five, seven or nine inoculated larvae. Contamination by one inoculated larva was sufficient to transmit *N. lymantriae* to 28.5 ± 24.7 % of healthy larvae. An increase in the infection rate occurred up to the density of five inoculated larvae (infection rate 96.7 ± 8.2 %) after which a further increase was impossible. The transmission experiments with *E. schubergi* gave no results. The inoculated larvae were not infectious when they were used in the experiments, hence no transmission occurred. For *N. lymantriae*, the experiments unequivocally demonstrated feces are involved in horizontal transmission. Furthermore, the results allow the conclusion that light rainfall positively affects transmission of *N. lymantriae*.

Kurzfassung

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die experimentelle Bestätigung der horizontalen Transmission der Mikrosporidien *Nosema lymantriae* und *Endoreticulatus schubergi* durch den Kot infizierter und mit Eichenlaub ernährter Raupen von *Lymantria dispar*. Des weiteren wurden die Auswirkungen von simuliertem Regen und variierender Dichte inokulierter Raupen auf die Transmission der beiden Mikrosporidienarten untersucht. Dafür wurde Eichenlaub in Plexiglaszylindern durch die Anwesenheit und den Kot inokulierter Raupen (16 Tage nach oraler Verabreichung von 1×10^3 Sporen pro Raupe) oder nur durch den Kot kontaminiert. Bei einem Teil der Zylinder wurde zusätzlich mit Hilfe einer Gießkanne leichter Regen simuliert. Die alleinige Kontamination durch sporenhaltigen Kot war ausreichend, um *N. lymantriae* auf gesunde Raupen zu übertragen (Infektionsrate $4,4 \pm 7,3$ %). Die Simulation von leichten Niederschlägen führte zu einer signifikanten Steigerung der Infektionsrate auf $30,0 \pm 24,5$ %. Waren die inokulierten Raupen während der Kontamination im Zylinder anwesend, ergab sich eine noch höhere Übertragung (Infektionsrate $68,9 \pm 35,2$ %). Im zweiten Experiment erfolgte die Kontamination durch die Anwesenheit und den Kot von einer, drei, fünf, sieben oder neun inokulierten Raupen. Die Kontamination durch eine inokulierte Raupe war ausreichend, um *N. lymantriae* auf gesunde Raupen zu übertragen (Infektionsrate $28,5 \pm 24,7$ %). Eine Erhöhung der Infektionsrate erfolgte bis zur Dichte von fünf inokulierten Raupen (Infektionsrate $96,7 \pm 8,2$ %), wonach kein weiterer Anstieg mehr möglich war. Die Transmissionsversuche mit *E. schubergi* lieferten keine Ergebnisse. Die inokulierten Raupen waren zum Zeitpunkt der Experimente nicht infektiös, so dass keine Transmission festzustellen war. Für *N. lymantriae* erbrachte die Arbeit den eindeutigen experimentellen Nachweis der horizontalen Transmission durch Kot infizierter Raupen. Zusätzlich lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass leichte Niederschläge die Transmission von *N. lymantriae* positiv beeinflussen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. <i>Lymantria dispar</i>	2
1.1.1. Verbreitung	2
1.1.2. Ernährung	3
1.1.3. Biologie	3
1.1.4. Antagonisten.....	4
1.2. Mikrosporidien	6
1.2.1. <i>Nosema lymantriae</i>	8
1.2.2. <i>Endoreticulatus schubergi</i>	9
1.3. Ziel der Arbeit	10
2. Material und Methoden.....	11
2.1. <i>Lymantria dispar</i>	11
2.2. Mikrosporidien	11
2.3. Gewinnung von Sporen und Herstellung der Sporensuspension für die Inokulation.....	12
2.4. Inokulation von <i>Lymantria dispar</i>	12
2.6. Nahrungsumstellung von <i>Lymantria dispar</i> auf Eichenlaub.....	13
2.7. Testraupen	14
2.8. Rolle von Kot bei der horizontalen Übertragung von <i>Nosema lymantriae</i> und <i>Endoreticulatus schubergi</i>	14
2.8.1 Versuchsaufbau	14
2.8.2 Versuchsdurchführung.....	16
2.9. Veränderungen in der Transmissionsrate durch Variation der Dichte inokulierter Raupen	20
2.9.1. Versuchsaufbau	20
2.9.2. Versuchsdurchführung.....	20
2.10. Diagnose der Infektion.....	22
2.11. Nachversuch zur Infektiosität und dem Infektionsverlauf von <i>Endoreticulatus schubergi</i>	22
2.11.1. Versuchsdurchführung.....	23
2.12. Statistische Auswertung	23

2.12.1. Rolle von Kot bei der horizontalen Übertragung von <i>Nosema lymantriae</i> und <i>Endoreticulatus schubergi</i>	23
2.12.2. Veränderungen in der Transmissionsrate durch Variation der Dichte inokulierter Raupen.....	24
3. Ergebnisse	26
3.1. Rolle von Kot bei der horizontalen Übertragung von <i>Nosema lymantriae</i> und <i>Endoreticulatus schubergi</i>	26
3.1.1. <i>Nosema lymantriae</i>	26
3.1.2. <i>Endoreticulatus schubergi</i>	28
3.2. Veränderungen in der Transmissionsrate durch Variation der Dichte inokulierter Raupen	29
3.2.1. <i>Nosema lymantriae</i>	29
3.2.2. <i>Endoreticulatus schubergi</i>	33
3.3. Nachversuch zur Infektiosität und dem Infektionsverlauf von <i>Endoreticulatus schubergi</i>	34
4. Diskussion	35
4.1. Rolle von Kot bei der horizontalen Übertragung von <i>Nosema lymantriae</i>	35
4.2. Veränderungen in der Transmissionsrate durch Variation der Dichte von <i>Nosema lymantriae</i> inokulierten Raupen.....	38
4.3. Nachversuch zur Infektiosität und dem Infektionsverlauf von <i>Endoreticulatus schubergi</i>	40
4.4. Schlussfolgerungen	42
5. Literaturverzeichnis	43

1. Einleitung

Mikrosporidien sind obligat intrazellulär-parasitische Eukaryoten, die häufig tödlich endende Infektionen bei *Lymantria dispar*, dem Schwammspinner, hervorrufen. Während Mikrosporidien in Europa als Antagonisten des Schwammspinners weit verbreitet sind, konnten sie in Nordamerika bisher nicht nachgewiesen werden. Daraus ergab sich die Überlegung, geeignete Mikrosporidienarten nach Nordamerika einzuführen und sie im Rahmen der biologischen Kontrolle gegen den Schwammspinner einzusetzen (McManus und Solter 2003, McManus et al. 1989). Der Schwammspinner kann von unterschiedlichen Mikrosporidienarten infiziert werden, die den drei Gattungen *Nosema*, *Endoreticulatus* und *Vairimorpha* zugeordnet werden können. Die Arten unterscheiden sich in ihren Entwicklungszyklen, die sie im Insekt durchlaufen, und den Organen, die sie für ihre Entwicklung nutzen. Dadurch kommt es zu Unterschieden im Infektionsverlauf und bei der Transmission der Infektion innerhalb der Population (Goertz und Hoch 2008a & b, Maddox et al. 1998). Am Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz wurden Untersuchungen zur horizontalen und vertikalen Transmission mit den Arten *Nosema lymantriae*, *Endoreticulatus schubergi* und *Vairimorpha disparis* durchgeführt. Diese Untersuchungen zeigten, dass *N. lymantriae* und *E. schubergi* sowohl horizontal als auch vertikal übertragen werden können. Für *V. disparis* konnte die vertikale Übertragung nicht nachgewiesen werden. Die horizontale Übertragung beginnt bei *N. lymantriae* und *E. schubergi* bereits während der Larvalentwicklung des Schwammspinners. Mit dem Kot infizierter Raupen werden Dauersporen freigesetzt, die zur Weiterverbreitung der Infektion in der Population dienen. Die horizontale Übertragung von *V. disparis* beginnt erst nach dem Tod der Raupe, wenn Sporen aus dem sich zersetzenden Kadaver austreten können (Goertz und Hoch 2008a & b).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die zentrale Rolle von Kot bei der horizontalen Übertragung von *N. lymantriae* und *E. schubergi* experimentell bestätigt werden. Umweltfaktoren, wie die aufgenommene Nahrung und Regenereignisse, können bei dieser Übertragungsform entscheidende Einflussfaktoren im Transmissionsgeschehen darstellen und wurden in die

experimentellen Untersuchungen mit einbezogen. Eine weitere Fragestellung war die Auswirkung der Dichte inokulierter Raupen auf die Transmissionsrate der beiden Mikrosporidienarten.

1.1. *Lymantria dispar*

1.1.1. Verbreitung

Das natürliche Verbreitungsgebiet des Schwammspinner liegt im europäischen und asiatischen Raum. Es zieht sich bandförmig über Europa bis nach Japan. Die nördliche Grenze des Verbreitungsgebietes verläuft von Mittelschweden über Südfinnland in Richtung Moskau. Im Süden wird die Grenze durch die Küste der Mittelmeerländer gebildet. Der Verbreitungsschwerpunkt des Schwammspinner liegt in Süd- und Südosteuropa, vor allem im Bereich der Balkanländer. Auf Grund einer optimalen Kombination aus Trockenheit, Licht und Wärme, kommt es in diesen Gebieten in regelmäßigen Abständen zu Massenvermehrungen. Das Klima in Mitteleuropa ist weniger gut auf die Bedürfnisse des Schwammspinner zugeschnitten. Zu einem verstärkten Auftreten kommt es nur während Trockenzeiten und an warmen und trockenen Standorten (Wellenstein und Schwenke 1978). In Österreich können im Abstand von etwa zehn Jahren Massenvermehrungen des Schwammspinner beobachtet werden. Die letzte ereignete sich von 2003 bis 2005 (Hoch et al. 2006). Zwischen 1993 und 1995 kam es zeitgleich in vielen Gebieten Mitteleuropas zu Massenvermehrungen, die eine starke Entlaubung vieler Wälder zur Folge hatte (Bathon 1996, Hoch et al. 2001, Wulff 1996). Nordamerika zählt nicht zum natürlichen Verbreitungsgebiet des Schwammspinner. Er wurde 1869 durch Leopold Trouvelot für Zuchtversuche aus Frankreich in die Nähe von Medford, Massachusetts gebracht. Nachdem ihm unfreiwillig einige Raupen entkamen, ereignete sich bereits 1889 in dem Gebiet um Medford die erste Massenvermehrung. Seitdem breitet sich der Schwammspinner, trotz zahlreicher Bekämpfungsmaßnahmen, immer weiter aus (Lechowicz und Mauffette 1986, Nierhaus-Wunderwald und Wermelinger

2001). In regelmäßigen Abständen von etwa zehn bis elf Jahren kommt es zu Massenvermehrungen (Liebhold et al. 2000).

1.1.2. Ernährung

Der Schwammspinner ist ein polyphages Insekt, das sich an etwa 400 Holzpflanzenarten aus 54 Gattungen entwickeln kann (Lobinger und Skatulla 2001). Stehen dem Schwammspinner in einem Mischbestand unterschiedliche Pflanzenarten zur Verfügung, frisst er bevorzugt an *Quercus*-Arten, welche als Vorzugspflanzen ersten Grades gelten. Bei Eintritt eines Nahrungsmangels ist er in der Lage, auf andere Pflanzenarten seines Wirtsspektrums auszuweichen. Solange sich der Schwammspinner nicht in einer Massenvermehrung befindet, frisst er nur an Pflanzen, die zu seinem engen Wirtspflanzenspektrum gehören und ihm somit optimale Entwicklungsbedingungen bieten. Bei zunehmendem Nahrungsmangel, zum Beispiel im Verlauf einer Massenvermehrung, breitet er sein Fraßpflanzenspektrum immer weiter aus. Das Fressen an Pflanzen, die nicht zu seinem Wirtspflanzenspektrum gehören, wirkt sich negativ auf die Fekundität aus, führt zu einer Verzögerung der Entwicklung und bringt eine erhöhte Mortalität mit sich (Lobinger und Skatulla 2001, Wellenstein und Schwenke 1978).

1.1.3. Biologie

In Mitteleuropa schlüpfen die Raupen des Schwammspinners im Zeitraum von April bis Mai, jeweils von der herrschenden Witterung und den Klimabedingungen abhängig. Nach dem Schlüpfen bleiben die Raupen für einige Tage gemeinsam neben dem verlassenen Gelege sitzen, bevor sie sich in der Umgebung verbreiten und mit dem Blattfraß an ihren Wirtspflanzen beginnen. Während der ersten drei Larvenstadien fressen die Raupen tagsüber. Mit dem Übergang zum vierten Larvenstadium ändern sie ihr Verhalten und

fressen von dort an nachts, während sie am Tag ruhen. Alle Larvenstadien sind in der Lage, Seidenfäden zu spinnen. Im Fall eines Nahrungsmangels dienen sie den Raupen des ersten Larvenstadiums zur Ausbreitung. Auf Grund ihres geringen Gewichtes und der langen Haare können sie mit dem Wind passiv über große Strecken verbreitet werden. Die Entwicklung der Raupen ist von der vorherrschenden Witterung und der Nahrung abhängig und dauert zwischen sechs und zwölf Wochen. Die männlichen und weiblichen Raupen unterscheiden sich sowohl in der Anzahl ihrer Häutungen als auch in der Größe. Während sich die weiblichen Raupen vier- bis sechsmal häuten und am Ende ihrer Raupenentwicklung eine Größe von 60 – 70 mm erreichen, häuten sich die männlichen Raupen nur vier- bis fünfmal und werden 40 – 50 mm groß. Anfang Juli ist in Mitteleuropa die Entwicklung der Raupen soweit beendet, dass es zur Verpuppung kommen kann. Die Verpuppung findet zumeist an Zweigen oder Rindenritzen am Stamm statt, kann aber auch am Boden erfolgen. An das zwei- bis dreitägige Vorpuppenstadium schließt sich die Puppenruhe an, die 10 bis 23 Tage dauert. Die Puppenzeit der Weibchen ist gegenüber der der Männchen verkürzt, so dass die verlängerte Raupenentwicklung der Weibchen annähernd ausgeglichen wird. In der Zeit von Juli bis Anfang September liegt die Flugzeit der männlichen Falter. Bereits im Verlauf des ersten Tages nach dem Schlüpfen der Falter kommt es zur Kopulation und wenige Stunden später zur Eiablage durch die Weibchen. Damit beginnt die Embryonalentwicklung der Raupen, die nach drei bis vier Wochen beendet ist. Es schließt sich eine genetisch bedingte Diapause an, die mit dem Schlupf der Raupen im nächsten Jahr beendet wird (Wellenstein und Schwenke 1978).

1.1.4. Antagonisten

In seinem natürlichen Verbreitungsgebiet begegnet dem Schwammspinner ein großer Antagonistenkomplex aus Parasitoiden, Räubern und Pathogenen. Parasitoide treten im Ei-, Larven- und Puppenstadium auf, wobei die Bedeutung der Eiparasitoide im Vergleich zu den Larven- und Puppenparasitoiden meist

geringer ist (Hoch et al. 2001, Bathon 1996). Zu den Larven- und Puppenparasitoiden gehören zahlreiche Arten, deren Auftreten von der Populationsdichte, dem Entwicklungsstand der Population und dem Standort abhängt (Hoch et al. 2001). Sowohl die Vertreter der Eiparasitoide als auch der Larven- und Puppenparasitoide gehören den Ordnungen der Dipteren und Hymenopteren an. Als Räuber von Raupen und Puppen gelten vor allem Vögel, die Käfer *Calosoma sycophanta*, *C. inquisitor* und *Xylodrepa quadripunctata* sowie die Raubwanzen *Arma custos* und *Picromerus bidens* (Wellenstein und Schwenke 1978). Untersuchungen in Österreich haben gezeigt, dass die Mäuse *Apodemus flavicolis*, *A. sylvaticus*, *Clethrionomy glareolus* und die Schnabelfliege *Panorpa communis* ebenfalls als Räuber von Puppen auftreten (Gschwantner et al. 2002). Die Milben *Allothrombium wolffi* und *Thrombidium holosericeum* sind Eiräuber (Bathon 1993). Der Zusammenbruch einer Massenvermehrung ist oft auf das Auftreten von Pathogenen wie Viren, Mikrosporidien, Pilzen, Bakterien und Nematoden zurückzuführen. Das Kernpolyedervirus gilt als das wichtigste Pathogen, während die Bedeutung der Pilze, Bakterien und Nematoden als geringer beurteilt wird (Wellenstein und Schwenke 1978, Weiser 1998). In Europa sind sechs Mikrosporidienarten beschrieben (Maddox et al. 1999), deren Verbreitung in den Populationen zum Teil sehr unterschiedlich ist. Es wird angenommen, dass sich 15 – 30 % der Population während einer Massenvermehrung mit Mikrosporidien infizieren. Es gibt allerdings auch Untersuchungen aus Polen, der Ukraine und von Sardinien, in denen die Infektionsrate in der Population über 60 % betrug (McManus und Solter 2003). Im Gegensatz zum Kernpolyedervirus verursachen Mikrosporidien keine plötzlich auftretenden hohen Mortalitätsraten (McManus et al. 1989). In Abhängigkeit von der Mikrosporidienart kann der Tod der Raupe zwar bereits während der Larvalentwicklung eintreten, es kann aber auch eine Entwicklung bis ins Puppen- oder Adultstadium erfolgen (Maddox et al. 1998). Eine Mikrosporidieninfektion kann zusätzlich subletale Effekte mit sich bringen. Infizierte Raupen entwickeln sich langsamer, so dass der Zeitraum der Anfälligkeit für andere Antagonisten verlängert wird. Die Fekundität infizierter Weibchen ist herabgesetzt und die Mortalitätsrate der Eier während der Überwinterung ist erhöht (McManus et al. 1989).

Auf Grund der Einschleppung des Schwammspinners durch den Menschen fehlten in Nordamerika natürliche Gegenspieler. Schon frühzeitig wurde deshalb im natürlichen Verbreitungsgebiet nach Gegenspielern gesucht, die für die Aussetzung in Nordamerika geeignet schienen. Seit 1906 wurden mehr als 60 Arten freigesetzt, von denen sich einige Arten etablieren konnten (Kenis und Vaamonde 1998). Einer der wichtigsten Gegenspieler, der vor allem während hoher Populationsdichten auftritt und Gradationen beenden kann, ist das Kernpolyedervirus (McManus und Solter 2003). Der Pilz *Entomophaga maimaiga* wurde 1910 - 1911 aus Japan nach Nordamerika importiert. Da in Folge weder *E. maimaiga* noch andere entomopathogene Pilze in Schwammspinnerpopulationen nachgewiesen werden konnten, wurde angenommen, dass er sich nicht etablieren konnte. Jedoch kam es 1989 gleichzeitig in vielen Gebieten zu einem starken Auftreten des Pilzes mit hohen Mortalitätsraten in den betroffenen Schwammspinnerpopulationen (Andreadis und Weseloh 1990). Seitdem gilt er als entscheidender Mortalitätsfaktor während der Progradationsphase (McManus und Solter 2003). Während geringerer Populationsdichten sind außerdem kleine Säugetiere, die größere Raupen und Puppen fressen, sowie Larven- und Puppenparasitoide von Bedeutung (Liebhold et al. 2000, McManus und Solter 2003).

1.2. Mikrosporidien

Die erste Mikrosporidie, die beschrieben und benannt wurde, war der Erreger der Pébrine-Krankheit der Seidenraupe. Nägeli (1857) nannte sie *Nosema bombycis* und ordnete sie den Schicomyceten zu, da er sie als Hefe identifizierte. Durch Balbiani wurde 1882 die Ordnung Microsporidia geschaffen und *N. bombycis* als einzig bekannte Mikrosporidie eingeordnet. Die Ordnung Microsporidia wurde von Sprague (1976) durch den neu geschaffenen Stamm Microspora, der den Protozoa zugeordnet wurde, ersetzt (Joseph et al. 2005, Wittner 1999). Schließlich änderten Sprague und Becnel (1998) den Namen Microspora wieder in Microsporidia Balbiani 1882.

Auf Grund ihrer reduzierten Ultrastruktur, wie etwa fehlende Mitochondrien und Peroxisomen, wurde angenommen, dass Mikrosporidien die Nachfahren primitiver Eukaryoten darstellen, die sich vor der Entwicklung typischer Zellstrukturen von den restlichen Eukaryoten abgespalten haben (Agnew et al. 2002, Keeling und McFadden 1998). Mit der ersten phylogenetischen Studie auf Grundlage der kleinen Untereinheit der rRNA von *Vairimorpha necatrix* konnte vermeintlich bestätigt werden, dass es bereits sehr früh zu einer Abspaltung der Mikrosporidie von den restlichen Eukaryoten gekommen ist (Vossbrinck et al. 1987). Weitere phylogenetische Studien unterstützten zunächst ebenfalls die Hypothese der primitiven Eukaryoten (Keeling und Fast 2002, Keeling und McFadden 1998). Wiederlegt wurde die Hypothese schließlich mit dem Nachweis von Genen für Hsp70-Proteine. Damit wurde gezeigt, dass die Vorläufer der Mikrosporidien Mitochondrien besessen haben müssen (Germot et al. 1997). Phylogenetische Studien auf Grundlage der Gene für zum Beispiel die α - und β -Tubuline oder das TATA-Box-Bindeprotein haben eine Verwandtschaft der Mikrosporidien mit den Pilzen gezeigt (Keeling und Fast 2002, Van de Peer et al. 2000). Inzwischen werden Mikrosporidien als eigener Stamm dem Reich der Pilze zugeordnet (Hibbett et al. 2007).

Es sind mehr als 1200 Mikrosporidienarten in 150 Gattungen bekannt, die sowohl unter den Vertebraten als auch den Invertebraten einen breiten Wirtskreis haben. Die meisten Arten infizieren Fische und Insekten (Wittner 1999). Die Mikrosporidienarten unterscheiden sich nicht nur in den morphologischen Eigenschaften ihrer Sporen stark voneinander (Vavra und Larson 1999), sondern auch in den Entwicklungszyklen, die sie durchlaufen. Einige nutzen unterschiedliche Organe des Wirtes für Teile ihrer Entwicklung und bilden Sporen, die der Ausbreitung im Wirt dienen. Andere wiederum benötigen Zwischenwirte, um ihre Entwicklung vollenden zu können (Becnel und Andreadis 1999). Obwohl sich die zahlreichen Mikrosporidienarten in den Einzelheiten ihrer Entwicklungszyklen deutlich von einander unterscheiden, besitzen sie alle einen grundsätzlichen Ablauf, der aus drei Phasen besteht. Diese drei Phasen sind die infektiöse Phase, die proliferative Phase und die Sporogonie.

Die infektiöse Phase ist die einzige extrazelluläre Phase im Lebenszyklus der Mikrosporidien. In dieser Phase kommt es zum Ausscheiden reifer Dauersporen

durch infizierte Wirte und zur Aufnahme der Dauersporen durch einen neuen geeigneten Wirt (Cali und Takvorian 1999, Mathis et al. 2002). Die Dauersporen zeichnen sich durch eine dicke und widerstandsfähige Sporenwand, bestehend aus Exo- und Endospore, aus, die es ihnen ermöglicht, in der extrazellulären Umgebung zu überdauern. Ein weiteres Merkmal ist der Extrusionsapparat mit dem Polfaden (Dunn und Smith 2001, Vávra und Larsson 1999). Die Aufnahme der Dauersporen durch den Wirt erfolgt meist oral, so dass es im Darmlumen zum Auskeimen der Sporen kommt. Durch externe Stimulation wird der Polfaden ausgeschleudert und durchdringt die Wand einer neuen Wirtszelle. Anschließend wird das Sporoplasma durch den Polfaden in das Zytoplasma der Wirtszelle injiziert (Mathis et al. 2002, Vávra und Larsson 1999). Mit der Injektion des Sporoplasmas beginnt die intrazelluläre Entwicklung der Mikrosporidien. Diese besteht aus der proliferativen Phase, in der es zur Merogonie und Bildung von Meronten kommt und der anschließenden Sporogonie, die mit der Bildung von infektiösen Dauersporen endet (Cali und Takvorian 1999, Scheid 2007, Vávra und Larsson 1999).

1.2.1. *Nosema lymantriae*

Nosema lymantriae wurde erstmals durch Weiser (1957) beschrieben. Die Mikrosporidie zeichnet sich durch einen zweiteiligen Entwicklungszyklus aus, der in unterschiedlichen Organen des Wirtes stattfindet. Infektiöse Dauersporen werden von der Raupe oral aufgenommen und keimen im Mitteldarmlumen aus. In den Muskel- und Epithelzellen des Mitteldarms findet der erste Teil der Entwicklung statt. Nach einer primären Merogonie und Sporogonie kommt es zur Bildung von Primärsporen (wie von Maddox et al. (1999) für die nahe verwandte *N. portugal* beschrieben). Die Primärsporen dienen der Ausbreitung der Infektion im Wirt. Sie infizieren die Spinndrüsen, den Fettkörper, die Gonaden und die Malphigischen Gefäße (Goertz und Hoch 2008a). In diesen Organen kommt es zum zweiten Teil der Entwicklung, der die sekundäre Merogonie und Sporogonie umfasst und mit der Bildung von Dauersporen endet (Maddox et al. 1999).

Die Ausbreitung der Mikrosporidieninfektion in der Population kann sowohl horizontal als auch vertikal erfolgen (Goertz und Hoch 2008a & b). Die horizontale Übertragung beginnt während der Larvalentwicklung durch das Ausscheiden von Dauersporen mit dem Kot. Dies geschieht unter Laborbedingungen, bei einer Inokulationsdosis von 1×10^3 Sporen/Raupe, etwa 12 – 19 Tage nach der Inokulation (Goertz und Hoch 2008a). Mikrosporidien der Gattung *Nosema* werden als mäßig pathogen eingestuft. Der Tod infizierter Raupen kann während der Larvalstadien eintreten oder es erfolgt eine Entwicklung bis ins Adultstadium (Maddox et al. 1998). Unter Laborbedingungen trat der Tod bei einer Inokulationsdosis von 1×10^3 Sporen/Raupe nach 25 Tagen ein. Kommt es im Verlauf der Larvalentwicklung zum Tod der Raupe, stellen die bei der Kadaverzersetzung freigesetzten Dauersporen einen zweiten Weg der horizontalen Übertragung dar (Goertz und Hoch 2008a). Die vertikale Übertragung erfolgt transovariell durch infizierte Weibchen (Goertz und Hoch 2008b). Bei dieser Form der Übertragung wird der Embryo bereits im Ei infiziert (Becnel und Andreadis 1999).

1.2.2. *Endoreticulatus schubergi*

Endoreticulatus schubergi wurde erstmals von Zwölfler (1927) beschrieben. Der Entwicklungszyklus dieser Mikrosporidie beschränkt sich auf den Mitteldarm. Nach der oralen Aufnahme von Dauersporen durch die Raupe keimen diese im Mitteldarmlumen aus und infizieren die Zellen des Mitteldarmepithels. In den Mitteldarmepithelzellen finden Merogonie und Sporogonie statt. Der Entwicklungszyklus wird mit der Bildung von Dauersporen beendet (Goertz und Hoch 2008a, Maddox et al. 1998, Zwölfler 1927). Im Vergleich mit *N. lymantriae* ist *E. schubergi* deutlich weniger pathogen. Raupen, die unter Laborbedingungen mit einer Sporendosis von 1×10^3 Sporen/Raupe inokuliert wurden, starben im Durchschnitt nach 46 Tagen. Viele der infizierten Raupen überlebten bis zum Adultstadium. Der Tod tritt häufig erst ein, wenn die Entwicklung der Schwammspinnerpopulation so weit fortgeschritten ist, dass keine anfälligen Raupenstadien mehr zur Verfügung stehen. Somit ist der

Hauptweg der horizontalen Übertragung bei dieser Mikrosporidie die Infektion durch Dauersporen aus dem Kot infizierter Raupen. Bei einer Inokulationsdosis von 1×10^3 Sporen/Raupen konnten die ersten Dauersporen 9 – 19 Tage nach der Inokulation im Kot nachgewiesen werden (Goertz und Hoch 2008a). Die vertikale Übertragung von *E. schubergi* erfolgt transovum (Goertz und Hoch 2008b). Bei dieser Form der Übertragung werden die Eioberfläche oder andere Bestandteile des Eigeleges mit Sporen kontaminiert. Die Raupen nehmen diese Sporen nach dem Schlüpfen oral auf (Becnel und Andreadis 1999).

1.3. Ziel der Arbeit

Dass die Ausscheidung von Dauersporen mit dem Kot infizierter Raupen ein wichtiger Übertragungsweg für die Mikrosporidien *N. lymantriae* und *E. schubergi* darstellt, konnte mit den Untersuchungen von Goertz und Hoch (2008a) gezeigt werden. Allerdings wurde in ihren Experimenten eine Kunstdiät auf Weizenkeimbasis als Nahrung für die Raupen verwendet. Die Kunstdiät unterscheidet sich in der Qualität von der natürlichen Nahrung und wirkt sich auf die Konsistenz des von den Raupen abgegebenen Kotes aus.

In der vorliegenden Arbeit sollte unter der Verwendung von Eichenlaub bestätigt werden, dass die Mikrosporidieninfektion durch die Dauersporen aus dem Kot infizierter Raupen auf gesunde Raupen übertragen werden kann. Dafür wurde in den durchgeführten Versuchen der direkte Kontakt zwischen infizierten und gesunden Raupen ausgeschlossen. Der erste Versuch wurde in Haltungssystemen, bestehend aus zwei Plexiglaszylindern, durchgeführt. Die Zylinder wurden entweder nur durch den Kot infizierter Raupen oder durch die Anwesenheit und den Kot infizierter Raupen kontaminiert. Zusätzlich wurde in einem Haltungssystem Regen simuliert. Damit sollten mögliche Veränderungen in der Transmissionsrate durch verstärktes Austreten von Dauersporen aus aufgelösten Kotpartikeln oder bessere Verteilung ausgetretener Dauersporen gegenüber den trockenen Haltungssystemen festgestellt werden. Im zweiten Versuch wurde die Dichte der infizierten Raupen in den Plexiglaszylindern variiert und die Auswirkung auf die Transmissionsrate untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. *Lymantria dispar*

Für die Versuche wurden Raupen von *Lymantria dispar* des New Jersey Standard Strain verwendet. Die Eigelege, aus denen die Raupen herangezogen wurden, stammten vom USDA-APHIS Otis Method Development Center, Massachusetts, USA.

Sowohl die verwendeten Eigelege als auch die daraus geschlüpften Raupen wurden im Klimaschrank bei einer Tagtemperatur von 24°C und einer Nachttemperatur von 18°C und unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit) gehalten. Bis zum Schlüpfen der Raupen wurden die Eigelege in einer Petrischale aufbewahrt. Nach dem Schlüpfen wurden die Raupen in kleinen Gruppen in Gefäße aus Kunststoff mit einem Volumen von 250 ml umgesetzt. Als Nahrung wurde eine Kunstdiät auf Weizenkeimbasis nach Bell et al. (1981) verwendet.

2.2. Mikrosporidien

Für die Versuche wurden die Mikrosporidien *Nosema lymantriae* (Isolate No. 1996-A) und *Endoreticulatus schubergi* (Isolate No. 1996-B) verwendet. Die Mikrosporidien werden am Illinois Natural History Survey (INHS), Urbana-Champaign, Illinois, USA aufbewahrt. Die für die Versuche verwendeten Mikrosporidien stammen ursprünglich vom INHS, werden aber am Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz weitervermehrt und gelagert.

2.3. Gewinnung von Sporen und Herstellung der Sporensuspension für die Inokulation

Die für den Versuch verwendeten Sporen wurden vor Versuchsbeginn aus inokulierten Raupen im fünften oder sechsten Larvenstadium gewonnen. Die Raupen wurden einzeln mit Kohlenstoffdioxid betäubt und anschließend seziiert. Für die Isolation von *N. lymantriae* wurde die Spinndrüse, für *E. schubergi* der Mitteldarm entnommen. Nach dem Entfernen der jeweiligen Organe wurden diese in einem Gewebehomogenisator mit destilliertem Wasser zerkleinert, das Homogenisat durch Zellstoff gefiltert und 15 Minuten bei 3500 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in destilliertem Wasser gelöst und noch einmal bei 3500 U/min zentrifugiert. Abermals wurde der Überstand verworfen und das erhaltene Pellet mit destilliertem Wasser gemischt. Anschließend wurde die Sporensuspension im Verhältnis 1:1 mit Glycerin gemischt und bis zur Durchführung der Inokulationen in flüssigem Stickstoff gelagert. Die längste Lagerung betrug zwei Monate.

Für die Inokulation der Raupen wurde eine Sporensuspension mit der Konzentration 1×10^3 Sporen/ μ l verwendet. Dafür wurde die original Sporensuspension nach starker Verdünnung mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Abhängig von der Konzentration wurde eine weitere Verdünnung bis zur erforderlichen Konzentration durchgeführt.

2.4. Inokulation von *Lymantria dispar*

Die Inokulation mit *N. lymantriae* bzw. *E. schubergi* erfolgte 16 Tage vor Versuchsbeginn. Es wurden nur Raupen inokuliert, die sich den ersten Tag im dritten Larvenstadium befanden. Um dies zu gewährleisten, wurden am Vortag alle Raupen in Vorhäutung zum dritten Larvenstadium ausgewählt und in Petrischalen ohne Futter überführt. Die Vorhäutung ist an dem Vorschieben der Kopfkapsel zu erkennen. Die Raupen verblieben bis zum nächsten Tag bei 24°C/18°C und Langtagbedingungen im Klimaschrank. Alle Raupen, die sich während dieser Zeit nicht gehäutet hatten, wurden verworfen.

Die Inokulation der Raupen wurde in einer Zellkulturplatte (24-Well Plate) durchgeführt. In jede Vertiefung wurde ein 2 mm³ großer Würfel der Weizenkeimdiät gelegt, auf den 1 µl der Sporensuspension (Konzentration 1×10^3 Sporen/µl) aufgebracht wurde. Anschließend wurde in jede Vertiefung eine Raupe gesetzt. Die Zellkulturplatten wurden über Nacht in den Klimaschrank (24°C/18°C, Langtagbedingungen) gestellt. Raupen, die am nächsten Tag den Futterwürfel nicht komplett gefressen hatten, wurden verworfen. Der Rest wurde in belüfteten Kunststoffbechern (Volumen 250 ml) mit Weizenkeimdiät überführt und im Klimaschrank (24°C/18°C, Langtagbedingungen) für acht Tage weiter gehalten. Die Becher wurden während dieser Zeit, je nach Bedarf, zumeist einmal erneuert.

2.6. Nahrungsumstellung von *Lymantria dispar* auf Eichenlaub

Um die Auswirkungen natürlicher Nahrung auf die Transmission der Mikrosporidien erfassen zu können, musste eine Nahrungsumstellung von der Weizenkeimdiät auf Eichenlaub erfolgen. Diese wurde sieben Tage vor Versuchsbeginn (neun Tage nach der Inokulation) durchgeführt. Dadurch wurde gewährleistet, dass keine Auswirkungen auf den Kot durch die Weizenkeimdiät mehr vorhanden waren. Zusätzlich wurde vermieden, dass die Belastungssituation durch die Nahrungsveränderung gemeinsam mit der fortgeschrittenen Infektion zu einem vorzeitigen Tod der Raupen führen könnte. Als Nahrung wurde Laub verwendet, das am Vorabend von einer Zerreiche (*Quercus cerris*) entnommen wurde. Das Laub wurde in Gläsern, deren Öffnung zum Schutz vor Verdunstung mit Parafilm verschlossen wurde, gewässert. Die Nahrungsumstellung wurde in Plexiglaszylindern im Klimaschrank (21°C Dauertemperatur, Langtagbedingungen) durchgeführt. Während der achttägigen Umstellungsperiode wurde das Laub einmal erneuert.

2.7. Testraupen

Als Testraupen werden im Folgenden alle Raupen bezeichnet, die zu Versuchsbeginn gesund sind. Sie wurden nach denselben Kriterien wie die Raupen für die Inokulation ausgewählt. Zum Zeitpunkt des Versuchsansatzes befanden sich die Testraupen den ersten Tag im dritten Larvenstadium.

2.8. Rolle von Kot bei der horizontalen Übertragung von *Nosema lymantriae* und *Endoreticulatus schubergi*

Ziel des Versuches war, unter der Verwendung von natürlicher Nahrung experimentell zu bestätigen, dass die horizontale Übertragung von *N. lymantriae* und *E. schubergi* durch den Kot inokulierter Raupen erfolgt. Zusätzlich wurde die Auswirkung verschieden starker Kontaminationssituationen und der Einfluss von simuliertem Regen auf die Infektionsrate untersucht.

Der Versuch wurde in drei Haltungssystemen, bestehend aus zwei Plexiglaszylindern, durchgeführt. Die Zylinder wurden zunächst durch die Anwesenheit und den Kot bzw. nur durch den Kot inokulierter Raupen kontaminiert. Anschließend kamen gesunde Testraupen in die Zylinder, die nach Abschluss des Versuches mikroskopisch auf eine Infektion mit *N. lymantriae* bzw. *E. schubergi* untersucht wurden. Zur besseren Unterscheidung werden die Haltungssysteme wie folgt benannt: Haltungssystem „Ohne Regen“, Haltungssystem „Ohne Regen – mit Boden“ und Haltungssystem „Simulierter Regen“.

2.8.1 Versuchsaufbau

Die zwei Plexiglaszylinder (Höhe 28 cm, Innendurchmesser 19,4 cm) eines Haltungssystems wurden übereinander angeordnet und durch ein Stahlgitter

(Maschenweite 4 mm) getrennt (Abbildung 2.1.). Durch das Gitter war ein Durchtritt von Kot vom oberen in den unteren Zylinder möglich, der Durchtritt der Raupen aber wurde verhindert. Der obere Zylinder wurde mit Gaze verschlossen, um den Austritt der Raupen zu verhindern. Der Boden des Haltungssystems wurde in Abhängigkeit von der Behandlung gewählt. Haltungssysteme mit Beregnung bekamen ein Stahlgitter als Bodenplatte, um zu verhindern, dass sich das Wasser im Zylinder staut. Zusätzlich wurde unter das Gitter eine Schale gesetzt, in der das Wasser aufgefangen wurde. In Haltungssystemen ohne Beregnung wurde der Boden durch eine Kunststoffplatte gebildet. Damit die Zylinder fest übereinanderstehen, wurde der gesamte Aufbau mit Klebebandstreifen fixiert. Als Nahrung wurde den Raupen Eichenlaub angeboten. Es wurde, wie bei der Nahrungsumstellung beschrieben, in verschlossenen Gläsern gewässert und in der Mitte des Zylinders platziert. Die verwendete Laubmenge entsprach einer Blattfläche von zwanzig normal großen Blättern.

Die Versuche wurden im geschützten Freiland (überdachter Balkon) von Juni bis Juli durchgeführt. Zum Schutz vor Ameisen wurde an der Außenseite der Zylinder ein Streifen Paraffinöl aufgebracht.

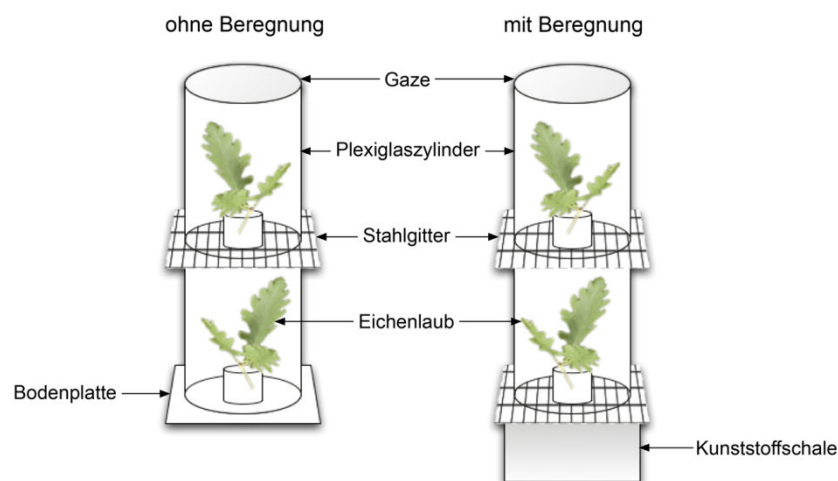


Abbildung 2.1. Graphische Darstellung des Versuchsaufbaus.

2.8.2. Versuchsdurchführung

Am ersten Versuchstag wurden in den oberen Zylinder fünf Raupen gesetzt, die 16 Tage zuvor inokuliert worden waren. In dieser Phase kam es in den Untersuchungen von Goertz und Hoch (2008a) bei beiden Mikrosporidienarten zur Ausscheidung von infektiösen Dauersporen mit dem Kot. Die inokulierten Raupen blieben 24 Stunden im oberen Zylinder des Haltungssystems. Anschließend wurden sie für die später erfolgende Untersuchung auf Mikrosporidien eingefroren und die Haltungssysteme für den weiteren Versuchsverlauf umgebaut.

Haltungssystem „Ohne Regen“ (Abbildung 2.2.)

Im oberen Zylinder des Haltungssystems wurde die Infektionsrate der Testraupen bestimmt, wenn zuvor inokulierte Raupen im Zylinder anwesend waren. Dafür wurde der Kot als Infektionsquelle aus dem Zylinder entfernt. Das Eichenlaub wurde durch leichtes Schütteln vom Kot gereinigt und das Gitter durch eine saubere Kunststoffplatte ersetzt. Im unteren Zylinder des Haltungssystems wurde die Infektionsrate der Testraupen bestimmt, wenn sich Kot infizierter Raupen auf dem angebotenen Eichenlaub befand. Es wurde nur der Kot verwendet, der beim Herabfallen aus dem oberen Zylinder auf dem Eichenlaub des unteren Zylinders liegen geblieben war. Dafür wurde der Boden des unteren Zylinders mit dem daraufliegenden Kot entfernt und durch eine neue Kunststoffplatte ersetzt. Das Eichenlaub wurde ohne Veränderungen wieder in der Mitte des Zylinders platziert. In jeden Zylinder wurden zehn Testraupen gesetzt.

Um auszuschließen, dass das Eichenlaub bereits vor Versuchsbeginn mit Mikrosporidien kontaminiert war, wurde eine Kontrolle mit zehn gesunden Raupen in einem Zylinder mit Eichenlaub durchgeführt.

Sowohl die Test- als auch die Kontrollraupen verblieben für 72 Stunden in den Zylindern. Damit sich die Infektion voll entwickeln konnte und eine verlässliche mikroskopische Diagnose möglich war, wurden die Test- und Kontrollraupen anschließend 21 Tage einzeln in belüfteten Kunststoffgefäßen (Volumen 50 ml)

auf Weizenkeimdiät im Klimaschrank (21°C Dauertemperatur, Langtagbedingungen) weiter gezüchtet. Am Ende der Einzelhaltung wurden die Test- und Kontrollraupen bis zur mikroskopischen Untersuchung eingefroren. Raupen, die sich während der Einzelhaltung verpuppten oder starben, wurden bereits zu diesem Zeitpunkt eingefroren.

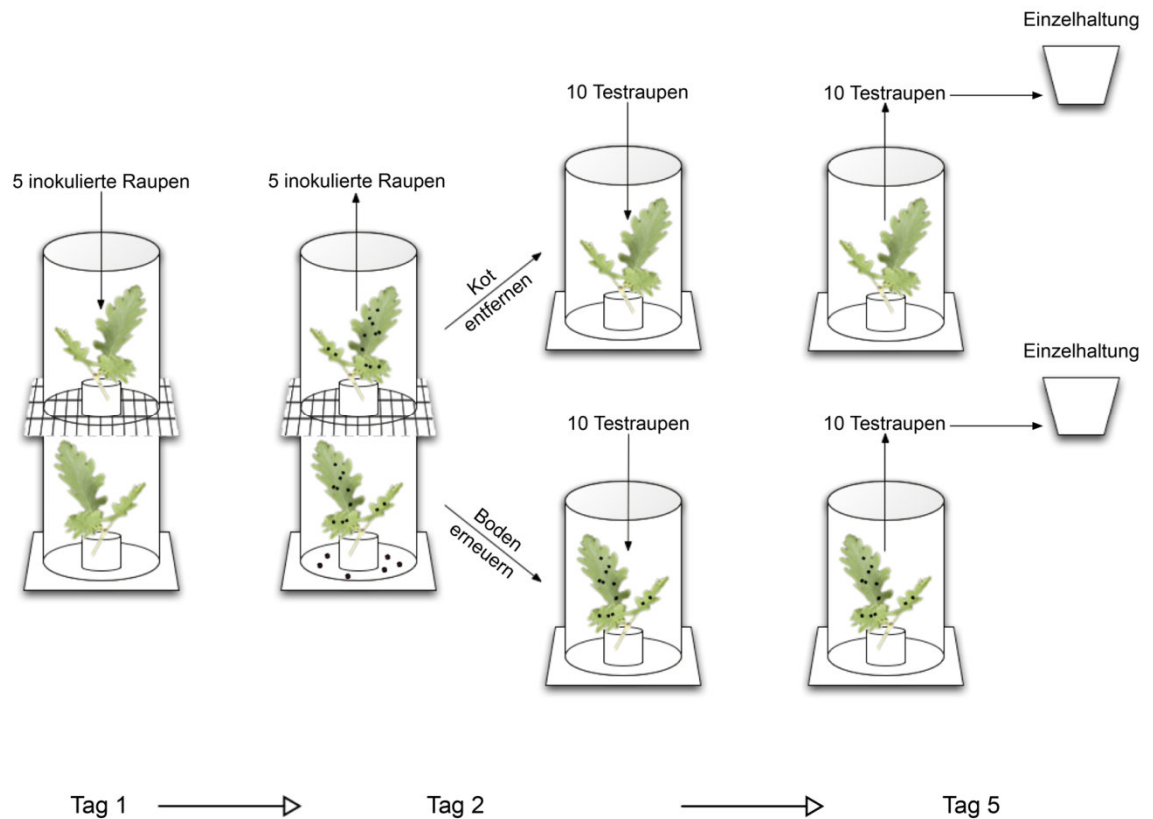


Abbildung 2.2. Umbau des Haltungssystems „Ohne Regen“ während der fünf Versuchstage.

Haltungssystem „Ohne Regen – mit Boden“ (Abbildung 2.3.)

Der Aufbau erfolgte wie beim Haltungssystem „Ohne Regen“. Nach dem Umbau wurde jedoch nur der untere Zylinder weiter verwendet. In diesem wurde die Infektionsrate bestimmt, wenn Kot infizierter Raupen auf dem Laub

und dem Boden vorhanden war. Ohne dass Veränderungen an dem Zylinder vorgenommen wurden, wurden zehn Testraupen platziert. Diese verblieben 72 Stunden in dem Zylinder und wurden anschließend in die oben beschriebene Einzelhaltung überführt.

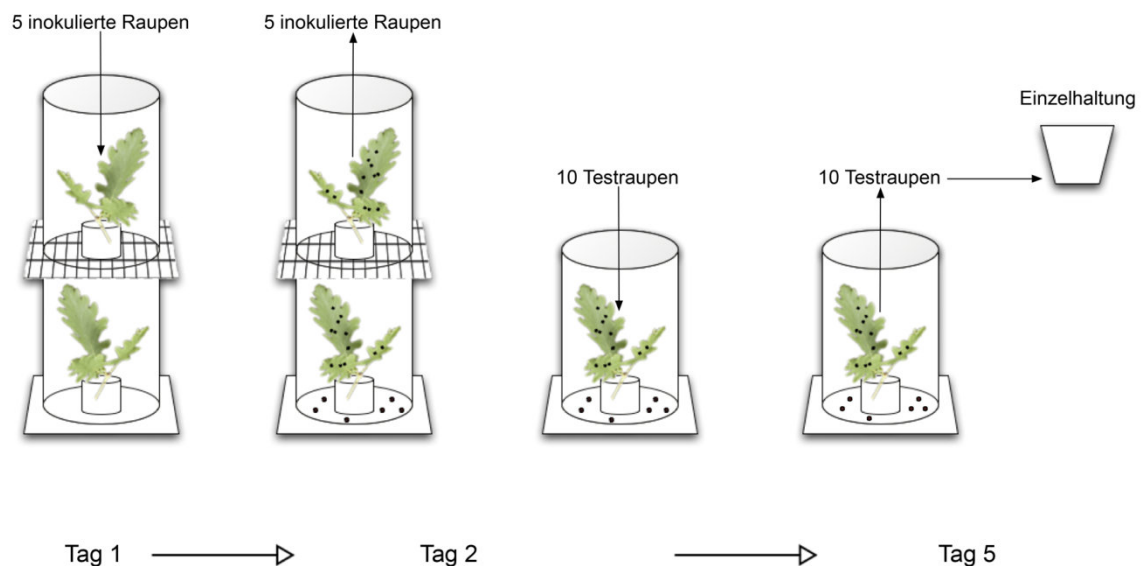


Abbildung 2.3. Umbau des Haltungssystems „Ohne Regen – mit Boden“ während der fünf Versuchstage.

Haltungssystem „Simulierter Regen“ (Abbildung 2.4.)

In beiden Zylindern wurde die Infektionsrate unter Einfluss des simulierten Regens bestimmt. Beide Zylinder wurden durch den Kot inokulierter Raupen kontaminiert, der obere zusätzlich durch die Anwesenheit der inokulierten Raupen. Das Haltungssystem wurde im Abstand von 14 Stunden, am Abend des ersten und am Morgen des zweiten Versuchstages, mit 200 ml Wasser beregnet. Die Beregnung wurde mit einer Gießkanne durchgeführt. Um eine zu starke Beregnung zu vermeiden, wurde der Aufsatz der Gießkanne mit Parafilm verschlossen und lediglich ein Loch geöffnet. Beim Umbau am zweiten

Versuchstag erhielten beide Zylinder eine saubere Bodenplatte. Weitere Veränderungen wurden nicht vorgenommen und in jeden Zylinder zehn Testraupen gesetzt. Am fünften Versuchstag wurden die Testraupen aus den Zylindern entfernt und in die oben beschriebene Einzelhaltung überführt.

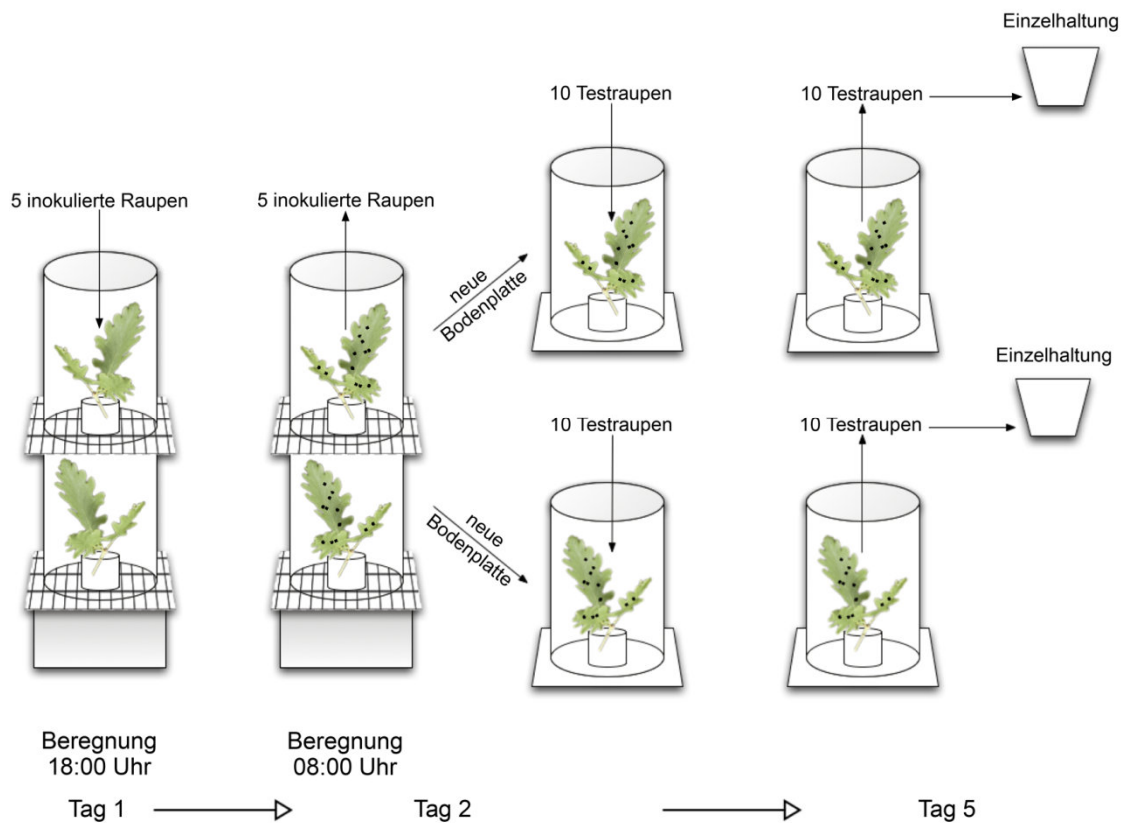


Abbildung 2.4. Umbau des Haltungssystems „Simulierter Regen“ während der fünf Versuchstage.

Der Versuch erstreckte sich über einen Zeitraum von fünf Tagen und wurde für jede Mikrosporidienart dreimal wiederholt. Die Wiederholungen erfolgten im wöchentlichen Abstand. In einer Wiederholung wurde jedes Haltungssystem dreimal aufgebaut, so dass jede Behandlungsvariante getrennt neunmal wiederholt wurde. Nach jedem Versuchsdurchgang wurden alle verwendeten Teile sorgfältig in Chlorbleiche desinfiziert.

2.9. Veränderungen in der Transmissionsrate durch Variation der Dichte inokulierter Raupen

In diesem Versuch ging es um die Frage, ob die Dichte der inokulierten Raupen die Transmission von *N. lymantriae* oder *E. schubergi* durch Kot beeinflusst. Der Versuch wurde in Plexiglaszylindern durchgeführt, die durch die Anwesenheit und den Kot inokulierter Raupen kontaminiert wurden. Anschließend kamen gesunde Testraupen in die Zylinder, die nach Abschluss des Versuches mikroskopisch auf eine Mikrosporidieninfektion untersucht wurden.

2.9.1. Versuchsaufbau

Für den Versuch wurden die oben beschriebenen Plexiglaszylinder einzeln verwendet, so dass jeder eine feste Bodenplatte bekam. Als Nahrung diente ebenfalls Eichenlaub, das in verschlossenen Gläsern gewässert und in der Mitte des Zylinders platziert wurde. Die verwendete Laubmenge entsprach einer Blattfläche von zwanzig normal großen Blättern.

Die Versuche wurden im geschützten Freiland (überdachter Balkon) von Juli bis August durchgeführt. Zum Schutz vor Ameisen wurde an der Außenseite der Zylinder ein Streifen Paraffinöl aufgebracht.

2.9.2. Versuchsdurchführung

Der Versuch wurde mit fünf unterschiedlichen Dichten inokulierter Raupen durchgeführt. Als Dichte wurden eine, drei, fünf, sieben und neun inokulierte Raupen gewählt. Am ersten Versuchstag, 16 Tage nach der Inokulation, wurden die inokulierten Raupen in die Zylinder gesetzt (Abbildung 2.5.). Nach 24 Stunden wurden sie entfernt und ohne Veränderungen am Zylinder vorzunehmen, wurden zehn Testraupen hineingesetzt. Die inokulierten Raupen

wurden für die später erfolgende mikroskopische Untersuchung auf Mikrosporidien eingefroren. Um auszuschließen, dass das verwendete Laub bereits vor Versuchsbeginn mit Mikrosporidien kontaminiert war, wurde am zweiten Versuchstag eine Kontrolle mit zehn gesunden Raupen auf Eichenlaub angesetzt. Die Testraupen und die Kontrollraupen verblieben 72 Stunden in den Zylindern. Anschließend wurden sie in die oben beschriebene Einzelhaltung überführt.

Der Versuch in den Zylindern erstreckte sich über einen Zeitraum von fünf Tagen und wurde in wöchentlichem Abstand wiederholt. In einer Wiederholung wurde jede Dichte dreimal angesetzt. Der Versuch wurde für beide Mikrosporidienarten zweimal durchgeführt, so dass jede Variante sechsmal wiederholt wurde. Nach jedem Versuchsdurchgang wurden alle verwendeten Teile sorgfältig in Chlorbleiche desinfiziert.

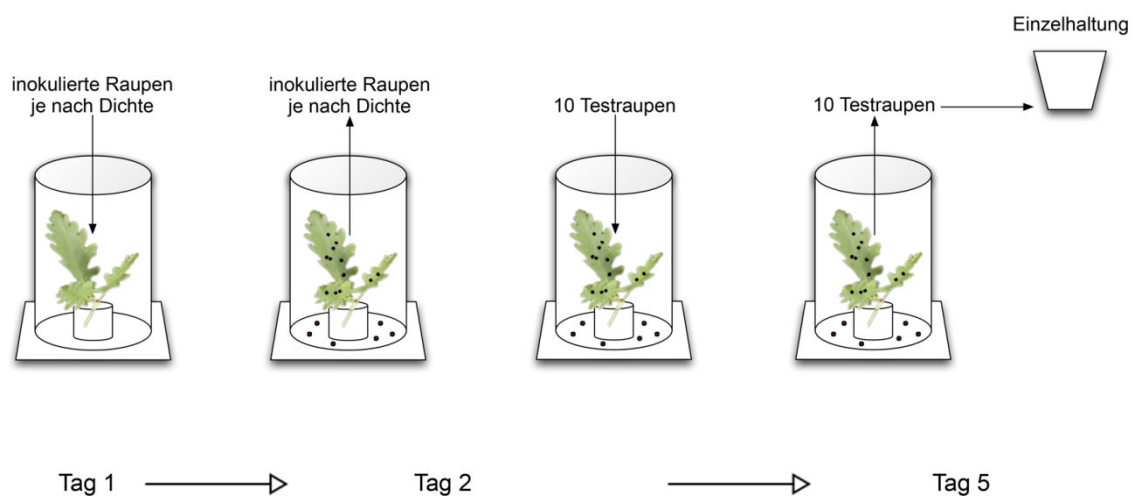


Abbildung 2.5. Ablauf des Versuches während der fünf Versuchstage.

2.10. Diagnose der Infektion

Die Raupen wurden nach der Einzelhaltung lichtmikroskopisch auf eine Infektion mit Mikrosporidien untersucht.

Die Diagnose der *N. lymantriae* Infektion konnte mit Hilfe von Querschnitten durch den Insektenkörper durchgeführt werden. Bei den Raupen wurde mit einer Hautschere zwischen dem ersten und zweiten Bauchbein ein Querschnitt durchgeführt und eine dünne Gewebescheibe entnommen, die Gewebeteile der Spinndrüse, des Fettkörpers, des Darmes und der Malpighischen Gefäße enthielt. Hatten sich die Raupen bereits verpuppt, wurde zwischen dem zweiten und dritten Ring von hinten ein Querschnitt durch die Puppe durchgeführt und eine Probe des weißen Körperinhaltes entnommen. Die Präparate wurden im Phasenkontrastmikroskop bei 400-facher Vergrößerung auf Sporen von *N. lymantriae* untersucht.

Der Nachweis der Infektion mit *E. schubergi* war mit Hilfe der Querschnitt-Methode nicht möglich, da die Infektionsentwicklung nicht wie gewünscht verlaufen ist. Zusätzlich ist die Diagnose von *E. schubergi* schwieriger, da die Sporen deutlich kleiner sind als die von *N. lymantriae*. Um die Diagnose der Infektion mit *E. schubergi* stellen zu können, wurden die Raupen seziert und der Darm entnommen. Anschließend wurden Proben des Mitteldarms entnommen und im Phasenkontrastmikroskop bei 400-facher Vergrößerung auf Sporen von *E. schubergi* untersucht. Des weiteren wurden Giemsa-Färbungen einiger Präparate durchgeführt.

2.11. Nachversuch zur Infektiosität und dem Infektionsverlauf von *Endoreticulatus schubergi*

Dieser Versuch wurde durchgeführt, da bei keiner der inokulierten Raupen eine Infektion mit *E. schubergi* nachgewiesen werden konnte. Als Ursache für den fehlerhaften Infektionsverlauf kommt in Frage: (1) Fehlende Infektiosität der verwendeten Sporen, (2) verminderte Ausbreitung der Sporen im Mitteldarm durch die Nahrungsumstellung oder (3) Verzögerung des Infektionsverlaufs

durch die Temperatur während der Nahrungsumstellung. Der zeitliche Ablauf der Versuche war anhand der Daten von Goertz und Hoch (2008a) geplant worden. Deren Untersuchungen fanden allerdings bei 24°C/18°C und auf Weizenkeimdiät statt.

2.11.1. Versuchsdurchführung

Die Inokulation erfolgte mit Sporen von *E. schubergi*, die gemeinsam mit den Sporen für die vorangegangenen Versuche aus infizierten Raupen gewonnen worden waren. Die Inokulation erfolgte, wie oben beschrieben, mit einer Dosis von 1×10^3 bzw. 5×10^4 Sporen pro Raupe. Die Raupen wurden in belüfteten Kunststoffbechern (Volumen 250 ml) auf Weizenkeimdiät bei 24°C/18°C und Langtagbedingungen gehalten. Neun Tage nach der Inokulation wurden die Raupen auf sieben Gruppen aufgeteilt. Vier Gruppen wurden auf 21°C Dauertemperatur gesetzt, der Rest verblieb bei 24°C/18°C. Für alle wurden die Langtagbedingungen beibehalten. Die Untersuchung auf eine erfolgte Infektion wurde 16 bzw. 27 Tage nach der Inokulation durchgeführt.

2.12. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit PASW Statistics 18 (SPSS Inc., Chicago, Illinois).

2.12.1. Rolle von Kot bei der horizontalen Übertragung von *Nosema lymantriae* und *Endoreticulatus schubergi*

Zu Beginn der statistischen Analyse wurde der Kolmogorov-Smirnov Test zum Testen der Normalverteilung sowie der Levene Test zum Testen der

Varianzhomogenität durchgeführt. Da die Daten weder normalverteilt noch varianzhomogen waren, wurden in weiterer Folge nichtparametrische Tests verwendet. Die Infektionsraten der Behandlungsvarianten wurden mit dem Kruskal-Wallis Test verglichen. Die paarweisen Vergleiche der Infektionsraten innerhalb eines Haltungssystems (oberer und unterer Zylinder) wurden mit dem Wilcoxon Test durchgeführt. Zum Vergleich der Infektionsraten unterschiedlicher Haltungssysteme wurde der Mann-Whitney Test gewählt.

2.12.2. Veränderungen in der Transmissionsrate durch Variation der Dichte inokulierter Raupen

Die Auswirkung der Dichte der inokulierten Raupen auf die Zahl der neu infizierten Testraupen wurde nach Winkeltransformation (Arcus-Sinus-Transformation) der Daten mit Hilfe der Regressionsanalyse beurteilt.

Für jede Dichte der inokulierten Raupen wurde der Transmissionskoeffizient v mit Hilfe der folgenden Gleichung (Gl. 2.1.), basierend auf der Arbeit von Dwyer und Elkinton (1993), berechnet.

Gl. 2.1.

$$v = \frac{-\ln \left[1 - \left(\frac{I}{S} \right) \right]}{t \cdot P}$$

Dabei ist I die Anzahl der neu infizierten Testraupen, S die Anzahl der Testraupen, t die Verweilzeit der Testraupen im Haltungssystem und P die Anzahl der Sporen, die während des Aufenthalts der inokulierten Raupen pro m² im Haltungssystem freigesetzt wurde.

Um die Anzahl der Sporen (Y) zu berechnen, die von einer Raupe bis zum Tag x nach der Inokulation (dpi) freigesetzt worden waren, wurde die Gleichung von Goertz und Hoch (2008a) verwendet.

Gl. 2.2.

$$\ln(Y) = -15,425 + 9,9386 \cdot \ln(dpi)$$

Die Anzahl der Sporen, die während des Aufenthalts aller inokulierten Raupen pro m² im Haltungssystem freigesetzt worden waren, wurde mit Gl. 2.3. berechnet. Die Fläche des Haltungssystems berechnet sich aus der Blattfläche des angebotenen Eichenlaubs (0,022 m² - Annahme nach D. Goertz, unpublizierte Daten) und der Bodenfläche des Zylinders (0,029 m²).

Gl. 2.3.

$$P = \frac{(\text{freigesetzte Sporen dpi 17} - \text{freigesetzte Sporen dpi 16})}{(0,022\text{m}^2 + 0,029\text{m}^2)} \cdot \text{Anzahl inokulierter Raupen}$$

3. Ergebnisse

3.1. Rolle von Kot bei der horizontalen Übertragung von *Nosema lymantriae* und *Endoreticulatus schubergi*

3.1.1. *Nosema lymantriae*

Die Infektionsrate im Haltungssystem „Ohne Regen“ betrug im oberen Zylinder (inokulierte Raupen anwesend, kein Kot) $68,9 \pm 35,2$ % (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung), im unteren Zylinder (keine inokulierten Raupen, Kot auf Blättern) $4,4 \pm 7,3$ %. Im Haltungssystem „Ohne Regen – mit Boden“ wurde im unteren Zylinder (keine inokulierten Raupen, Kot auf Blättern und Boden) eine Infektionsrate von $12,4 \pm 14,8$ % ermittelt. Im Haltungssystem „Simulierter Regen“ ergab sich für den oberen Zylinder (inokulierte Raupen anwesend, Kot auf Blättern) eine Infektionsrate von $94,4 \pm 7,3$ % und im unteren Zylinder (keine inokulierten Raupen, Kot auf Blättern) eine Infektionsrate von $30,0 \pm 24,5$ % (Abbildung 3.1.). Die Infektionsraten der fünf Behandlungsvarianten fielen in den einzelnen Wiederholungen teilweise sehr unterschiedlich aus (Tabelle 3.1.), wodurch die hohen Standardabweichungen zu erklären sind.

Der Kruskal-Wallis Test ergab einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den fünf Kontaminationsarten der Zylinder ($\chi^2 = 30,910$, $df = 4$, $p < 0,001$). Der statistische Vergleich der Infektionsraten des oberen und unteren Zylinders aus dem berechneten sowie dem nicht berechneten Haltungssystem zeigte in beiden Fällen eine signifikant höhere Infektionsrate im oberen Zylinder (Wilcoxon Test, $p = 0,004$). Beim Vergleich der Infektionsraten in den oberen Zylindern konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Variante mit und ohne Berechnung nachgewiesen werden (Mann-Whitney Test, $p = 0,269$). Beim Vergleich der unteren Zylinder (Kot auf Blättern) der beiden Haltungssysteme konnte gezeigt werden, dass die Infektionsrate unter dem Einfluss von simuliertem Regen signifikant höher war (Mann-Whitney Test, $p = 0,01$). Ob sich zusätzlich zum Kot auf dem Laub noch Kot auf dem Boden befand, hatte bei trockenen Bedingungen keinen signifikanten Unterschied in der Infektionsrate zur Folge (Mann-Whitney Test, $p = 0,204$).

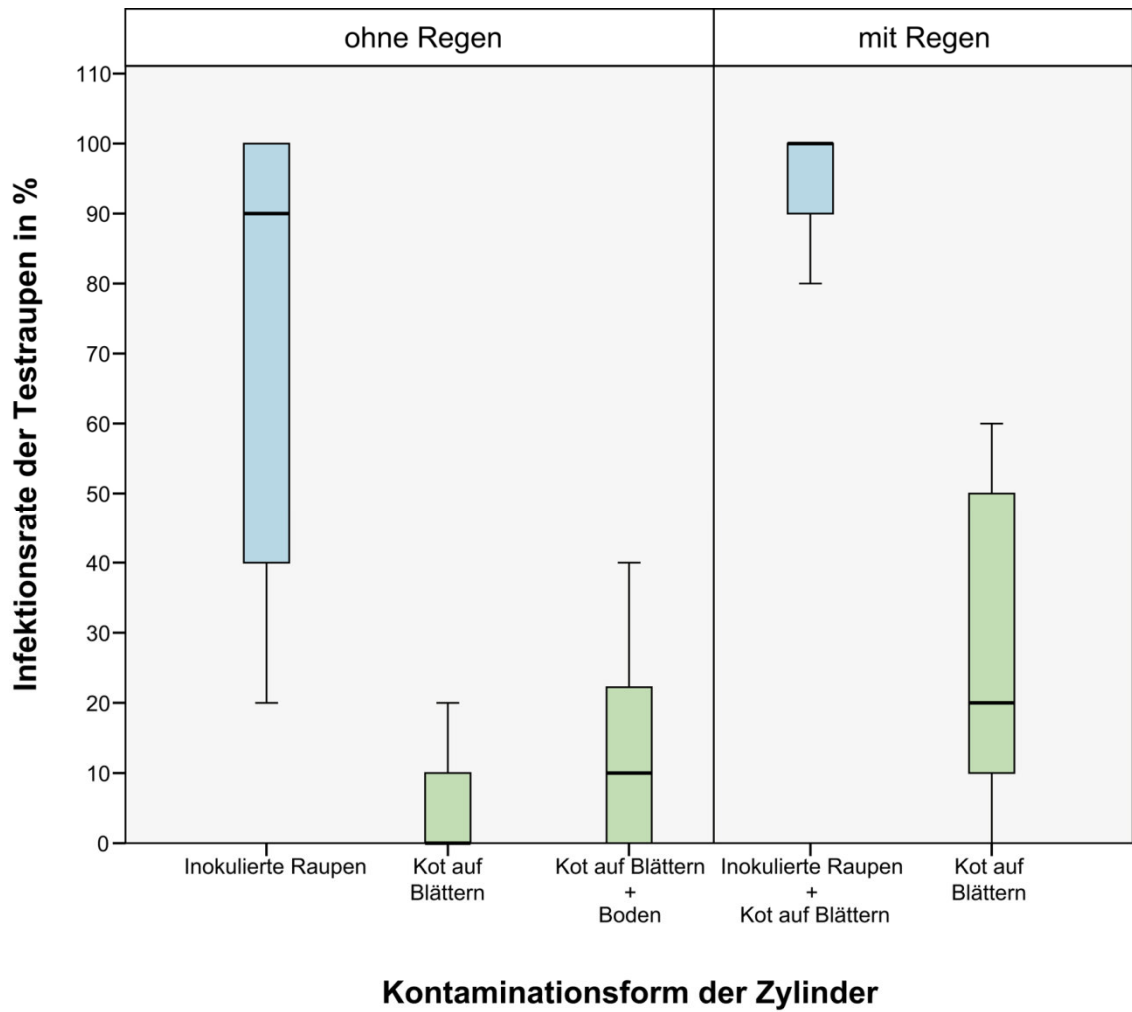


Abbildung 3.1. Anzahl der Testraupen in %, die sich in fünf verschiedenen kontaminierten Zylindern mit *N. lymantriae* infiziert haben (Ergebnisse aus neun Wiederholungen zu je zehn Testraupen). Die Kontamination erfolgte durch (1) Anwesenheit inokulierter Raupen, (2) Kot auf dem Eichenlaub, (3) Kot auf dem Eichenlaub und dem Zylinderboden, (4) Anwesenheit inokulierter Raupen, Kot auf dem Eichenlaub und simuliertem Regen oder (5) Kot auf dem Eichenlaub und simuliertem Regen.

Tabelle 3.1. Infektionsrate (%) der Testraupen: Einzelwerte der neun durchgeführten Wiederholungen. Die Infektionsrate gibt den Anteil der Testraupen wieder, die sich während des Aufenthalts in fünf verschiedenen kontaminierten Zylindern mit *N. lymantriae* infiziert haben.

Versuchsdurchgang	ohne Regen			mit Regen	
	Anwesenheit inokulierter Raupen	Kot auf Blättern	Kot auf Blättern + Boden	Anwesenheit inokulierter Raupen + Kot auf Blättern	Kot auf Blättern
1	40	0	20	90	50
	90	0	11	90	10
	100	10	30	100	60
2	100	0	0	100	50
	100	20	10	90	10
	100	10	0	100	60
3	20	0	0	100	10
	30	0	0	80	20
	40	0	40	100	0

3.1.2. *Endoreticulatus schubergi*

Bei der mikroskopischen Untersuchung der mit *E. schubergi* inokulierten Raupen konnte keine Infektion nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde auf eine Auswertung der Testraupen verzichtet.

3.2. Veränderungen in der Transmissionsrate durch Variation der Dichte inokulierter Raupen

3.2.1. *Nosema lymantriae*

Bei Anwesenheit einer inokulierten Raupe im Haltungssystem ergab sich unter den eingesetzten Testraupen eine Infektionsrate von $28,5 \pm 24,7 \%$. Wurde die Anzahl der inokulierten Raupen auf drei bzw. fünf Tiere erhöht, kam es zu einem Anstieg der Infektionsraten auf $76,7 \pm 17,5 \%$ bzw. $96,7 \pm 8,2 \%$. Befanden sich sieben inokulierte Raupen im Zylinder, betrug die Infektionsrate $93,0 \pm 11,0 \%$. Die größte Dichte wurde durch neun inokulierte Raupen gebildet. Dabei ergab sich eine Infektionsrate von $98,1 \pm 4,5 \%$. Die Infektionsraten geben den Mittelwert der sechs durchgeführten Wiederholungen wieder. In einigen Wiederholungen kam es zu sehr unterschiedlichen Infektionsraten (Tabelle 3.2.), was sich auch in den hohen Standardabweichungen widerspiegelt.

Tabelle 3.2. Infektionsrate (%) der Testraupen: Einzelwerte der sechs durchgeführten Wiederholungen. Die Infektionsrate gibt den Anteil der Testraupen wieder, die sich während des Aufenthalts in fünf unterschiedlich stark kontaminierten Zylindern mit *N. lymantriae* infiziert haben.

Versuchsdurchgang	Anzahl inokulierter Raupen				
	1	3	5	7	9
1	10	100	100	100	100
	60	70	100	100	100
	60	90	100	100	100
	10	70	100	100	100
2	11	50	80	78	100
	20	80	100	80	89

Die Regressionsanalyse ergab, dass die Auswirkung der Dichtesteigerung der inokulierten Raupen auf die Infektionsrate der Testraupen sowohl durch eine lineare Funktion ($R^2 = 0,565$, $p < 0,001$) (Abbildung 3.2.) als auch durch eine logarithmische Funktion beschrieben werden kann ($R^2 = 0,706$, $p < 0,001$) (Abbildung 3.3.). Das logarithmische Modell passt sich den vorliegenden Daten besser an, allerdings ist zu bedenken, dass bereits mit der gewählten Dichte von fünf inokulierten Raupen eine Infektionsrate von annähernd 100 % erreicht wurde. Als Regressionsgleichungen ergeben sich die folgenden Gleichungen:

- Lineare Funktion Gl. 3.1.

$$y = 0,113 \cdot x + 0,652$$

- Logarithmische Funktion Gl. 3.2.

$$y = 0,458 \cdot \ln(x) + 0,587$$

y = Infektionsrate der Testraupen

x = Anzahl der inokulierten Raupen

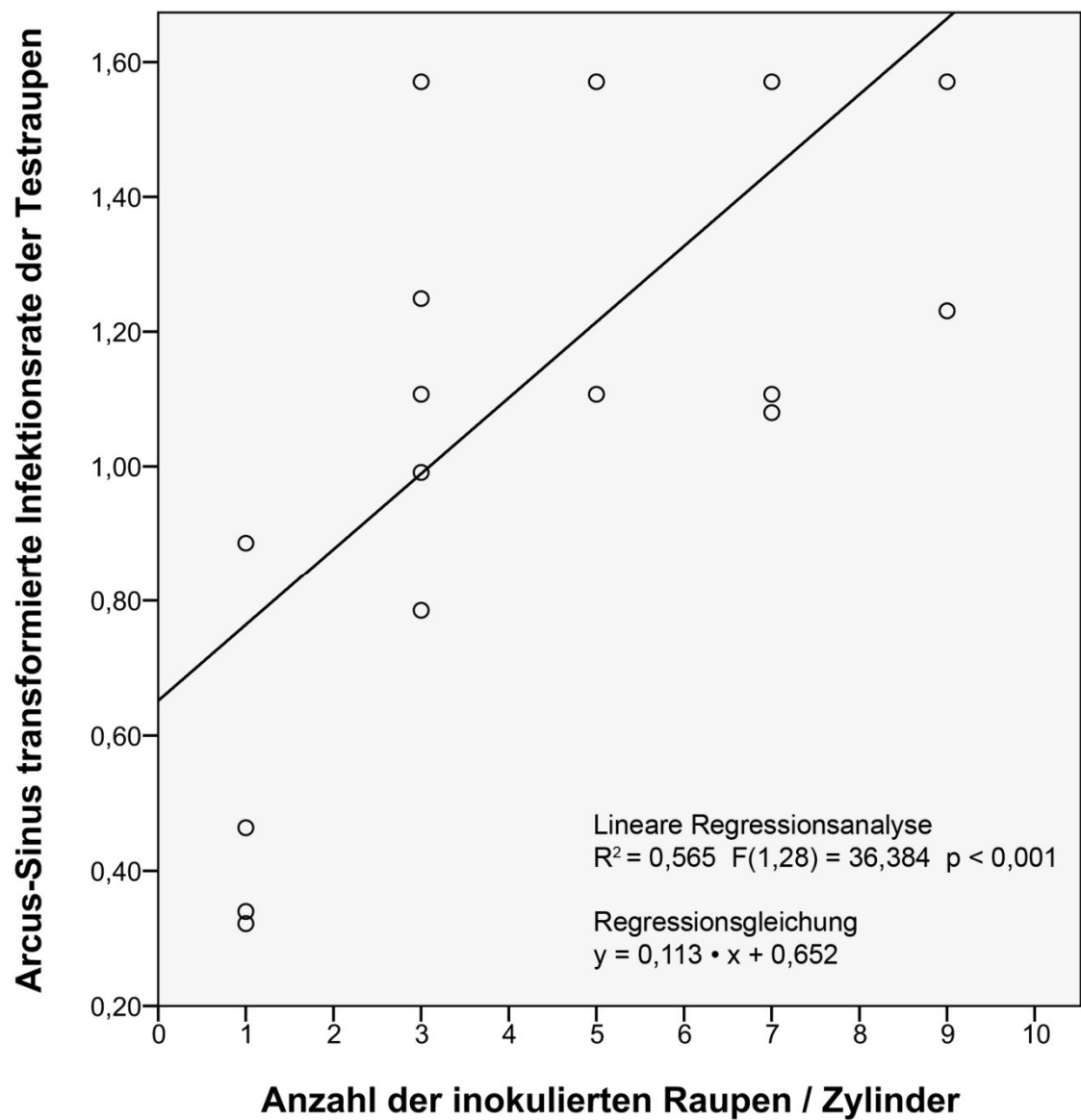


Abbildung 3.2. Regressionsgerade zwischen den Infektionsraten der Testraupen nach Winkeltransformation (Arcus-Sinus-Transformation) bei steigender Dichte inokulierter Raupen.

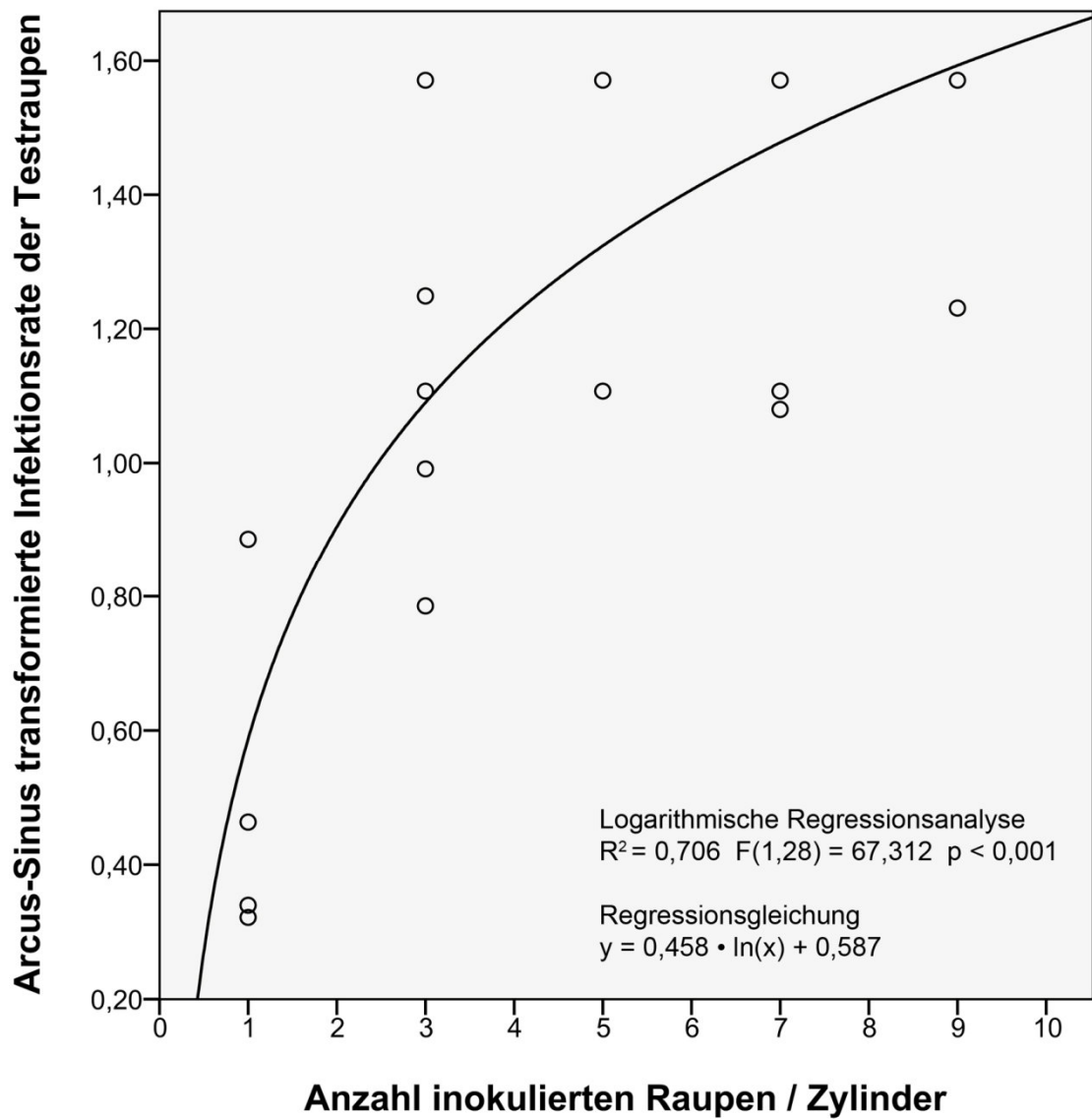


Abbildung 3.3. Logarithmische Regressionsgerade zwischen den Infektionsraten der Testraupen nach Winkeltransformation (Arcus-Sinus-Transformation) bei steigender Dichte inokulierter Raupen.

Berechnung des Transmissionskoeffizienten

Der Transmissionskoeffizient kann nicht berechnet werden, wenn die Infektionsrate im Zylinder 100 % beträgt. Da bei den Dichten mit fünf und neun inokulierten Raupen in fünf von sechs Wiederholungen Infektionsraten von 100 % erreicht wurden (Tabelle 3.2.), konnte ausschließlich für eine Wiederholung der Transmissionskoeffizient berechnet werden. Für die Dichten mit einer, drei bzw. sieben inokulierten Raupen im Zylinder konnte der Transmissionskoeffizient für sechs, fünf bzw. zwei Wiederholungen bestimmt werden. Anschließend wurde daraus der Mittelwert berechnet. Die berechneten Transmissionskoeffizienten sind in Tabelle 3.3. dargestellt.

Tabelle 3.3. Transmissionskoeffizient (m^2/d) bei steigender Dichte inokulierter Raupen.

Versuchsdurchgang	Anzahl inokulierter Raupen				
	1	3	5	7	9
1	$1,20 \times 10^{-8}$	$4,40 \times 10^{-8}$	$3,60 \times 10^{-8}$	$2,40 \times 10^{-8}$	$2,70 \times 10^{-8}$
	$1,02 \times 10^{-7}$	$8,50 \times 10^{-8}$	—	$2,50 \times 10^{-8}$	—
	$1,02 \times 10^{-7}$	$4,40 \times 10^{-8}$	—	—	—
2	$1,20 \times 10^{-8}$	$2,60 \times 10^{-8}$	—	—	—
	$1,30 \times 10^{-8}$	$5,90 \times 10^{-8}$	—	—	—
	$2,50 \times 10^{-8}$	—	—	—	—
Mittelwert aus den Wiederholungen	$4,43 \times 10^{-8}$	$5,16 \times 10^{-8}$	$3,60 \times 10^{-8}$	$2,45 \times 10^{-8}$	$2,70 \times 10^{-8}$

3.2.2. *Endoreticulatus schubergi*

Bei der mikroskopischen Untersuchung der inokulierten Raupen konnte keine Infektion nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde auf eine Auswertung der Testraupen verzichtet.

3.3. Nachversuch zur Infektiosität und dem Infektionsverlauf von *Endoreticulatus schubergi*

Die erste Untersuchung auf eine Infektion mit *E. schubergi* fand 16 Tage nach der Inokulation statt. Bei der mikroskopischen Untersuchung des Mitteldarmgewebes der Raupen, die mit 1×10^3 Sporen inokuliert worden waren, konnte weder bei den Raupen, die bei 21°C, noch bei den Raupen, die bei 24°C/18°C gehalten wurden, eine Infektion nachgewiesen werden (Tabelle 3.4.). Die Erhöhung der Inokulationsdosis auf 5×10^4 Sporen/Raupe führte dazu, dass sich bei 83,3 % der untersuchten Raupen, die bei 21°C gehalten wurden, eine nachweisbare Infektion entwickelt hatte.

Der zweite Teil der Raupen wurde 27 Tage nach der Inokulation untersucht. Die Inokulation mit 1×10^3 Sporen/Raupe führte bei den Raupen, die bei 21°C gehalten wurden, dazu, dass bei 95,8 % der untersuchten Tiere eine Infektion nachgewiesen werden konnte. Wurden die Raupen bei 24°C/18°C gehalten, waren alle untersuchten Raupen infiziert. Die Untersuchung der Raupen, die mit 5×10^4 Sporen/Raupe inokuliert wurden, ergab, dass alle untersuchten Raupen unabhängig von der Haltungstemperatur als *E. schubergi* infiziert diagnostiziert wurden.

Tabelle 3.4. Anteil der Raupen mit nachgewiesener *E. schubergi* Infektion bei unterschiedlicher Inokulationsdosis, Haltungstemperatur und Untersuchungszeitpunkt.

Sporen/Raupe	Haltungstemperatur (°C)	Untersuchungszeitpunkt (Tage nach der Inokulation)	Positiv getestete Raupen (%)	Anzahl der getesteten Raupen
1×10^3	21	16	0	18
1×10^3	21	27	96	24
1×10^3	24/18	16	0	10
1×10^3	24/18	27	100	12
5×10^4	21	16	83	12
5×10^4	21	27	100	16
5×10^4	24/18	27	100	13

4. Diskussion

4.1. Rolle von Kot bei der horizontalen Übertragung von *Nosema lymantriae*

In den Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass Dauersporen aus dem Kot infizierter und mit Eichenlaub ernährter Raupen zur Transmission von *N. lymantriae* auf gesunde Raupen beitragen. Goertz und Hoch (2008a) haben durch Untersuchung des Kotes *N. lymantriae* infizierter Raupen gezeigt, dass der Gehalt an Dauersporen im Kot hoch ist. In ihren Untersuchungen wurde allerdings eine Kunstdiät auf Weizenkeimbasis als Nahrung für die Raupen verwendet. Diese unterscheidet sich in der Qualität von natürlicher Nahrung und verändert die Konsistenz des Kotes, so dass die direkte Übertragung auf natürliche Bedingungen kritisch zu betrachten ist. Aus diesem Grund wurde im vorliegenden Versuch Eichenlaub als Nahrung für die Raupen verwendet.

Die unteren Zylinder der nicht beregneten Haltungssysteme wurden ausschließlich durch den Kot inokulierter Raupen kontaminiert. Hier lag die durchschnittliche Infektionsrate bei $4,4 \pm 7,3$ % bzw. bei $12,4 \pm 14,8$ %, wenn zusätzlich zum Kot auf den Blättern Kot auf dem Zylinderboden vorhanden war. Damit konnte erstmals experimentell gezeigt werden, dass bei Ernährung mit Eichenlaub sporenhaltiger Kot infizierter Raupen ein Mittel zur Übertragung der Mikrosporidieninfektion auf gesunde Raupen ist. Der Vergleich mit dem oberen Zylinder des nicht beregneten Haltungssystems (Kontamination durch Anwesenheit inokulierter Raupen, Kot entfernt) zeigte, dass die durchschnittliche Infektionsrate dort mit $68,9 \pm 35,2$ % signifikant höher war als in den unteren Zylindern. Dass eine zusätzliche Kontamination durch sporenhaltige Seide die Ursache für die höhere Infektionsrate war, kann ausgeschlossen werden, da die Raupen in Folge der Zerstörung der Spinndrüse die Abgabe von Seide weitestgehend einstellen (Goertz und Hoch 2008a). Obwohl kein Kontakt zwischen den inokulierten und den gesunden Raupen möglich war, hat sich die vorherige Anwesenheit der inokulierten Raupen deutlich auf die Übertragung der Infektion ausgewirkt. Es wäre möglich, dass die Bewegung der inokulierten Raupen auf dem Laub zu einer gleichmäßigeren Verteilung der Sporen geführt hat. Bei Untersuchungen mit

Nosema sp. kam es zur Übertragung der Infektion, wenn infizierte und gesunde Raupen am gleichen Futter fraßen, der Kot aber aus dem Haltungsgefäß entfernt wurde (Goertz et al. 2007). Durch Goertz und Hoch (2008a) wurde gezeigt, dass der Aufenthalt von gesunden und mit *N. lymantriae* infizierten Raupen im selben Haltungsgefäß ausreicht, um die Infektion zu übertragen.

Ein weiterer Bestandteil des Versuches war die Untersuchung der Auswirkungen von simuliertem Regen auf die Transmission der Infektion. Hier zeigte sich, dass es vor allem im unteren Zylinder (Infektionsrate $30,0 \pm 24,5$ %) zu einer signifikanten Steigerung der Infektionsrate im Vergleich zu der bei trockenen Bedingungen (Infektionsrate $4,4 \pm 7,3$ %) kam. Auch unter Beregnung zeigte sich wieder, dass die vorherige Anwesenheit der inokulierten Raupen zu einer signifikanten Steigerung der Infektionsrate ($94,4 \pm 7,3$ %) führte. Im oberen Zylinder (Anwesenheit inokulierter Raupen) war der Unterschied zwischen den Infektionsraten bei trockenen und beregneten Bedingungen statistisch nicht signifikant. Dabei ist allerdings zu beachten, dass auch unter trockenen Bedingungen in einigen Zylindern Infektionsraten von 100 % erreicht wurden und somit eine Steigerung durch Beregnung nicht mehr möglich war. Bei Betrachtung der Einzelwerte aus den neun durchgeführten Wiederholungen lagen die Infektionsraten der Beregnungsvariante tendenziell über den Infektionsraten der trockenen Variante. Dies steht im Gegensatz zu anderen Untersuchungen, in denen die Auswirkung von simuliertem Regen untersucht wurde. D'Amico und Elkinton (1995) verglichen die Transmission des Kernpolyedervirus (LdNPV) bei *L. dispar* Raupen auf übereinanderliegenden Eichenzweigen bei trockenen Bedingungen und künstlichem Regen. Auf den unteren Ästen war die Infektionsrate bei trockenen Bedingungen geringer, auf den oberen Ästen höher als auf den Ästen mit Beregnung, was auf ein Herunterspülen der Viruspartikel vom oberen auf den unteren Ast zurückgeführt wurde. Andere Untersuchungen haben sich mit der Wirkung von simuliertem Regen auf Bakterien- oder Pilzformulierungen beschäftigt. Beispielsweise trat nach Beregnung von *Brassica oleracea* eine reduzierte Mortalität bei *Trichoplusia ni* durch *Bacillus thuringiensis* auf (Behle et al. 1997). Konidien von *Metarhizium anisopliae* wurden durch Beregnung von Rapspflanzen heruntergewaschen, so dass eine geringere Mortalität von

Phaedon cochleariae auf den beregneten Pflanzen die Folge war (Inyang et al. 2000). Inglis et al. (1995) beregneten *Triticum aestivum* und *Medicago sativa*, nachdem zuvor eine Formulierung mit Konidien von *Beauveria bassiana* aufgebracht worden war. Auch hier kam es zu einer Reduzierung der Konidienkonzentration auf den Blättern durch den Regen. Es ist zu beachten, dass in diesen Versuchen starker Regen, im vorliegenden Versuch dagegen leichter Regen simuliert wurde. Starke Regenereignisse könnten ebenfalls zu einem verstärkten Abspülen des Kotes und der Sporen führen. Leichter Regen dagegen scheint die Konsistenz des Kotes dahingehend zu verändern, dass er besser auf der Blattfläche haften bleibt. Auch Tau- oder Nebelbildung könnten eine ähnliche Wirkung auf den Kot haben. Im vorliegenden Versuch wurde nicht berücksichtigt, welche Auswirkung das Verbleiben des Kotes auf den Blättern unter trockenen Bedingungen hat. Im Versuch zur Dichtesteigerung der vorliegenden Arbeit wurde eine Dichte mit fünf inokulierten Raupen verwendet, bei der in fünf von sechs Wiederholungen eine Infektionsrate von 100% erreicht wurde. Das Entfernen des Kotes von der Blattfläche hatte eine niedrigere Infektionsrate zur Folge (Kontamination durch Anwesenheit inokulierter Raupen, Kot entfernt, Infektionsrate $68,9 \pm 35,2$ %). Zieht man dieses Ergebnis in die Betrachtung mit ein, unterstützt es die Vermutung, dass Nässe ein verstärktes Anhaften des Kotes am Blatt bewirkt. Somit könnte im Freiland das Herunterwehen des sporenhaltigen Kotes durch Wind vermindert werden. Zusätzlich könnte das Austreten der Sporen aus dem Kot sowie die Verbreitung der Sporen auf dem Blatt gefördert werden. Dadurch würde sich die Wahrscheinlichkeit der Sporenaufnahme durch die Raupen erhöhen.

Die Infektionsraten in den neun Wiederholungen der fünf Behandlungsvarianten unterscheiden sich zum Teil sehr deutlich voneinander. Die Unterschiede treten sowohl beim Vergleich der drei Wiederholungen eines Versuchsdurchgangs auf als auch beim Vergleich aller neun Wiederholungen. In Untersuchungen von Goertz et al. (2007) kam es in der Transmission von *Nosema* sp. ebenfalls zu einer starken Variation der Infektionsrate einzelner Wiederholungen. Sie führten dies neben Unterschieden im Geschlecht der verwendeten Raupen auf Unterschiede in der Länge der Latenzperiode der einzelnen Raupe zurück. Vermutlich lassen sich die Unterschiede im vorliegenden Versuch ebenfalls mit

der individuellen Infektionsentwicklung in den verwendeten Raupen erklären. Das Experiment wurde 16 Tage nach der Inokulation der Raupen begonnen. Goertz und Hoch (2008a) zeigten, dass die ersten Sporen im Kot in Abhängigkeit von der Raupe in einem Zeitraum von 12 bis 19 Tagen nach der Inokulation freigesetzt werden und die Anzahl der freigesetzten Dauersporen in Abhängigkeit von der Zeit steigt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass der Beginn der Sporenfreisetzung bei den im vorliegenden Versuch verwendeten Raupen ebenfalls variabel war. Somit wäre auch die Anzahl der freigesetzten Dauersporen pro Raupe unterschiedlich und könnte die starke Variation der Infektionsrate der Testraupen erklären.

4.2. Veränderungen in der Transmissionsrate durch Variation der Dichte von *Nosema lymantriae* inokulierten Raupen

Die Variation der Dichte von einer bis neun inokulierten Raupen wurde durchgeführt, um die Kontamination der Zylinder mit Dauersporen aus dem Kot zu erhöhen und die Auswirkung auf die Infektionsrate gesunder Raupen zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigen, dass es mit steigender Dichte inokulierter Raupen zu einer steigenden Infektionsrate bei gesunden Raupen kommt.

Die Kontamination des Zylinders durch eine inokulierte Raupe reichte aus, um die Infektion erfolgreich zu übertragen. Die durchschnittliche Infektionsrate lag bei $28,5 \pm 24,7$ %. Erfolgte die Kontamination durch fünf inokulierte Raupen, betrug die durchschnittliche Infektionsrate bereits $96,7 \pm 8,2$ %. Die Erhöhung der Dichte auf sieben bzw. neun inokulierte Raupen brachte keine Veränderungen der Infektionsrate mit sich. Sie lag wie bereits bei der Kontamination durch fünf Raupen im Durchschnitt bei annähernd 100 %.

Die Daten lassen sich sowohl durch eine lineare als auch durch eine logarithmische Funktion erklären, die Anpassung der Daten an die logarithmische Funktion ist jedoch besser. Andere Untersuchungen zur Transmission von Pathogenen beim Schwammspinner weisen auf eine nichtlineare Änderung der Transmission in Abhängigkeit von der Dichte hin. Hoch et al. (2008) führten Untersuchungen zur horizontalen Übertragung von

N. lymantriae an eingekäfigten zwei Meter hohen Eichen durch. Inokulierte Raupen in steigender Dichte wurden gemeinsam mit gesunden Raupen in abnehmender Dichte auf Eichen gehalten. Zunächst kam es zu einer Erhöhung der Infektionsrate mit steigender Dichte, bei hohen Dichten kam es zu einer Stagnation. Dwyer et al. (1997) untersuchten die Transmission des Kernpolyedervirus (LdNPV) in Schwammspinnerpopulationen an eingezäunten Eichen in Abhängigkeit von der Pathogendichte und konnten zeigen, dass diese ebenfalls nicht linear verläuft. Auch Goertz (2004) konnte bei Untersuchungen zur Transmission von *Nosema* sp. nicht nachweisen, dass es zu einem linearen Anstieg der Transmission in Abhängigkeit von der Haltungsdichte kommt.

Im vorliegenden Versuch kann die bessere Anpassung der Daten an die logarithmische Funktion allerdings auf dem frühen Erreichen der hohen Infektionsraten beruhen. Es wurde bereits bei der Kontamination durch fünf inokulierte Raupen eine Infektionsrate von annähernd 100 % erreicht, so dass kein weiterer Anstieg der Infektionsrate mehr möglich war. Es kann somit keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine Steigerung der Transmission bei höheren Dichten erfolgt wäre.

Um eine weitere Aussage über die Änderung der Transmission in Abhängigkeit von der Dichte treffen zu können, wurde der Transmissionskoeffizient berechnet. Der Transmissionskoeffizient ist eine Konstante, die die Wahrscheinlichkeit der Infektion beim Kontakt zwischen dem Wirt und dem Pathogen wiedergibt (Anderson und May 1981). Demzufolge sollte der Transmissionskoeffizient im Fall einer linearen Änderung der Transmission in allen Wiederholungen den gleichen Wert aufweisen. Eine Berechnung des Transmissionskoeffizienten ist allerdings nur möglich, wenn die Infektionsrate unter 100 % liegt. Ab der dritten Dichte (fünf inokulierte Raupen) war dies nur noch viermal der Fall. Tendenziell sprechen die berechneten Transmissionskoeffizienten für eine nichtlineare Änderung der Transmission in Abhängigkeit von der Dichte, da diese mit steigender Zahl von Pathogenen abzunehmen scheint. Auf Grund der wenigen Werte ist eine verlässliche Aussage aber nicht möglich. Eine Möglichkeit, aussagekräftigere Daten zu erhalten, wäre eine Wiederholung des Experiments in größeren Haltungsgefäßen oder mit einer reduzierten Steigerung der Dichte inokulierter Raupen.

4.3. Nachversuch zur Infektiosität und dem Infektionsverlauf von *Endoreticulatus schubergi*

Dieser Nachversuch wurde durchgeführt, da bei der mikroskopischen Untersuchung der inokulierten Raupen keine Infektion mit *E. schubergi* nachgewiesen werden konnte und die Transmissionsversuche mit dieser Art somit keine Ergebnisse lieferten. Als Ursache für das Ausbleiben der Infektion wurde vermutet: (1) Fehlende Infektiosität der verwendeten Sporen, (2) verminderte Ausbreitung der Sporen im Mitteldarm durch die Nahrungsumstellung von Weizenkeimdiät auf Eichenlaub oder (3) Verzögerung des Infektionsverlaufs durch die Reduzierung der Temperatur (von 24°C/18°C auf 21°C Dauertemperatur) während der Nahrungsumstellung.

Da es im Nachversuch zu nachweisbaren Infektionen gekommen ist, kann ausgeschlossen werden, dass die verwendeten Dauersporen nicht infektiös waren. Ein Teil der Raupen wurde im Nachversuch bei 21°C auf Weizenkeimdiät gehalten. Bis auf die künstliche Nahrung entsprach diese Behandlungsvariante den Bedingungen der zuvor durchgeführten Versuche. Da in dieser Behandlungsvariante des Nachversuches ebenfalls keine Infektion nachgewiesen werden konnte, kann ausgeschlossen werden, dass die Nahrungsumstellung auf Eichenlaub für das Ausbleiben der Infektion verantwortlich ist.

Bei *N. lymantriae* bewirkt die Reduzierung der Temperatur auf 21°C eine Verzögerung des Krankheitsverlaufs in der Raupe. Die Latenzperiode verlängert sich und erste Dauersporen werden 15 Tage nach der Inokulation mit dem Kot freigesetzt, während sie bei 24°C bereits nach 13 Tagen nachzuweisen sind (Pollan 2009). Es ist wahrscheinlich, dass eine Reduzierung der Temperatur bei *E. schubergi* ebenfalls zu einer Verzögerung im Krankheitsverlauf führt und auch zum Ausbleiben der Infektion in den Versuchen beigetragen hat. Einiges deutet jedoch darauf hin, dass die Temperatur nicht die alleinige Ursache darstellt. Der zeitliche Ablauf der Versuche wurde auf Grundlage der Daten von Goertz und Hoch (2008a) geplant. Dabei konnten bei 24°C/18°C auf Weizenkeim diät die ersten Sporen neun Tage nach der Inokulation im Mitteldarm der Raupen nachgewiesen werden. Acht Tage später war der Mitteldarm mit Sporen gefüllt und die

Freisetzung von Sporen fand im Zeitraum von 9 bis 19 Tagen nach der Inokulation statt. Im Nachversuch wurde ebenfalls eine Gruppe von Raupen bei 24°C/18°C gehalten, bei denen aber 16 Tage nach der Inokulation keine Infektion nachgewiesen werden konnte. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass eine weitere Ursache zum Ausbleiben der Infektion beigetragen hat. Es konnte ausgeschlossen werden, dass die Sporen keine Infektiosität besessen haben, es wäre aber möglich, dass die Infektiosität beeinträchtigt war.

Da der Nachversuch nur mit kleinen Raupenzahlen durchgeführt wurde, ist eine definitive Aussage über die Ursache für das Ausbleiben der Infektion nicht möglich. Es ist wahrscheinlich, dass ein Zusammenwirken aus dem Herabsetzen der Temperatur und der beeinträchtigten Infektiosität des verwendeten Sporenmaterials zum Ausbleiben der Infektion beigetragen hat.

Die Versuche mit *E. schubergi* sollten wiederholt werden. Zuvor wäre es allerdings sinnvoll, umfangreichere Experimente zur Entwicklung von Infektionen mit *E. schubergi* bei unterschiedlichen Temperaturen durchzuführen. Als Alternative wäre es möglich, die Experimente zu einem späteren Zeitpunkt anzusetzen, um die Zeitspanne, während der die Raupen bei 21°C gehalten werden, auszudehnen. Da der Tod der Raupen bei Infektionen mit *E. schubergi* bei 24°C/18°C erst nach durchschnittlich 46 Tagen eintritt (Goertz und Hoch 2008a), wäre dies möglich. Weil für die Wiederholung der Versuche neue Sporen gewonnen werden, wäre ein erneutes Auftreten mangelnder Infektiosität auszuschließen. Dennoch sollten die im Versuch verwendeten inokulierten Raupen direkt nach dem Herausnehmen aus den Zylindern auf eine Infektion untersucht werden. So ist es möglich, den Versuch unter Umständen direkt zu wiederholen. Dieses Vorgehen war aus zeitlichen Gründen in den durchgeführten Versuchen nicht möglich. Die inokulierten Raupen wurden erst nach dem Beenden aller Versuche auf Infektionen untersucht, so dass ein rechtzeitiges Reagieren nicht mehr möglich war. Zusätzlich wäre es sinnvoll, schon vor Versuchsbeginn Stichproben der inokulierten Raupen auf Infektionen zu untersuchen. Sollte es wieder auffällige Ergebnisse geben, könnte die Behandlung vor dem Versuch angepasst werden.

4.4. Schlussfolgerungen

Die vorliegenden Versuche haben gezeigt, dass der Kot inokulierter Raupen bei Ernährung mit Eichenlaub zur Transmission von *N. lymantriae* beiträgt. Die Transmission war allerdings deutlich erhöht, wenn die infektiöse Raupe zuvor anwesend war. Wurde die Dichte der infizierten Raupen variiert, spiegelte sich dies in der Transmissionsrate wider. Es wird deutlich, dass durch Erhöhung der Kontamination der Umgebung die Transmission gefördert wird.

Neben der Populationsdichte haben auch abiotische Faktoren wie Temperatur und Niederschlag eine Bedeutung bei der Krankheitsübertragung. Ein wichtiger Aspekt bei der horizontalen Transmission ist die Latenzperiode der Raupe. Unter Freilandbedingungen kam es erst 20 Tage nach der Inokulation zur Übertragung von *N. lymantriae* auf gesunde Raupen (Hoch et al. 2008). In kleiner angelegten Versuchen kam es bereits zwischen 11 und 17 Tagen nach der Inokulation zur Transmission (Goertz und Hoch 2009). Die Temperatur, der die infizierte Raupe ausgesetzt ist, nimmt starken Einfluss auf die Infektionsentwicklung und die Länge der Latenzperiode (Pollan 2009). Neben der Temperatur kann auch Niederschlag den Erfolg der horizontalen Transmission beeinflussen. Leichte Niederschläge könnten dazu beitragen, die Kontamination der Umgebung zu fördern. Im vorliegenden Versuch wurde gezeigt, dass durch simulierten Regen eine deutliche Steigerung der Infektionsrate erreicht wurde. Die Befeuchtung des Kotes durch leichte Niederschläge, Tau oder Nebel könnte das Herunterwehen vom Laub durch Wind oder andere Faktoren vermindern und das Austreten sowie die Verteilung der Sporen fördern. Die Wahrscheinlichkeit der Sporenaufnahme durch eine gesunde Raupe würde somit erhöht werden.

Die förderliche Wirkung von leichtem Regen und der eindeutige Nachweis der Bedeutung des Kotes bei der horizontalen Transmission von *N. lymantriae* sind zwei wichtige Bausteine zur Komplementierung des Verständnisses der Wechselwirkungen zwischen dem Pathogen und seinem Wirtsinsekt.

5. Literaturverzeichnis

Agnew, P., Becnel, J. J., Ebert, D., Michalakis, Y. (2002): Symbiosis of Microsporidia and Insects. In: Bourtzis, K., Miller, T. (Hrsg.), Insect Symbiosis. CRC Press LLC, Boca Raton, S. 145-163.

Anderson, R. M., May, R. M. (1981): The population dynamics of microparasites and their invertebrate hosts. Philosophical transactions of the Royal Society of London, B, Biological Sciences 291, 451-524.

Andreadis, T. G., Weseloh, R. M. (1990): Discovery of *Entomophaga maimaiga* in North American gypsy moth, *Lymantria dispar*. Proceedings of the National Academy of Sciences 87, 2461-2465.

Bathon, H. (1993): Biologische Bekämpfung des Schwammspinner: Räuber und Parasitoide. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft 293, 117-112.

Bathon, H. (1996): Zur Bedeutung der Parasitoide beim Zusammenbruch der Schwammspinner-Gradation in Südhessen. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft 322, 74-90

Becnel J. J., Andreadis T. G. (1999): Microsporidia in Insects. In: Wittner, M. und Weiss, L. M. (Hrsg.), The Microsporidia and Microsporidiosis. ASM Press, Washington, D.C., S. 447-501.

Behle, R. W., McGuire, M. R., Shasha, B. S. (1997): Effects of sunlight and simulated rain on residual activity of *Bacillus thuringiensis* formulations. Journal of Economic Entomology 90, 1560-1566.

Bell, R. A., Owens, C. D., Shapiro, M., Tardi, V. J. R. (1981): Mass rearing and virus production. In: Doane, C. C., McManus, M. L. (Hrsg.), The Gypsy Moth:

Research toward Integrated Pest Management, USDA Washington, (U.S. Dept. Agric. For. Serv. Tech. Bull. 1584), S. 599-633.

Cali, A., Takvorian, P. M. (1999): Developmental morphology and life cycles of the microsporidia. In: Wittner, M. und Weiss, L. M. (Hrsg.), The Microsporidia and Microsporidiosis. ASM Press, Washington, D.C., S. 85-128.

D'Amico, V., Elkinton, J. S. (1995): Rainfall effects on transmission of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. Environmental Entomology 24, 1144-1149.

Dunn, A. M., Smith, J. E. (2001): Microsporidian life cycles and diversity: the relationship between virulence and transmission. Microbes and Infection 3, 381-388.

Dwyer, G., Elkinton, J. S. (1993): Using simple models to predict virus epizootics in gypsy moth populations. Journal of Animal Ecology 62, 1-11.

Dwyer, G., Elkinton, J. S., Buonaccorsi J. P. (1997): Host heterogeneity in susceptibility and disease dynamics: Tests of a mathematical model. The American Naturalist 150, 685-707.

Germot, A., Philippe, H., Le Guyader, H. (1997): Evidence for loss of mitochondria in microsporidia from a mitochondrial-type hsp70 in *Nosema locustae*. Molecular and Biochemical Parasitology 87, 159-168.

Goertz, D. (2004): Der Einfluss eines Parasiten auf seinen Wirt: das Beispiel *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera, Lymantriidae) und *Nosema* sp. (Microsporidia). Dissertation, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, Freie Universität Berlin.

Goertz, D., Pilarska, D., Kereselidze, M., Solter, L. F., Linde, A. (2004): Studies on the impact of two *Nosema* isolates from Bulgaria on the gypsy moth (*Lymantria dispar* L.). Journal of Invertebrate Pathology 87, 105-113.

Goertz, D., Solter, L. F., Linde, A. (2007): Horizontal and vertical transmission of a *Nosema* sp. (Microsporidia) from *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 95, 9-16.

Goertz, D., Hoch, G. (2008a): Horizontal transmission pathways of terrestrial microsporidia: A quantitative comparison of three pathogens infecting different organs in *Lymantria dispar* L. (Lep.: Lymantriidae) larvae. *Biological Control* 44, 196-206.

Goertz, D., Hoch, G. (2008b): Vertical transmission and overwintering of microsporidia in the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Journal of Invertebrate Pathology* 99, 43-48.

Goertz, D., Hoch, G. (2009): Three microsporidian pathogens infecting *Lymantria dispar* larvae do not differ in their success in horizontal transmission. *Journal of Applied Entomology* 133, 568-570.

Gschwantner, T., Hoch, G., Schopf, A. (2002): Impact of predators on artificially augmented populations of *Lymantria dispar* L. pupae (Lep., Lymantriidae). *Journal of Applied Entomology* 126, 66-73.

Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F. et al. (2007): A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111, 509-547.

Hoch, G., Zubrik, M., Novotny, J., Schopf, A. (2001): The natural enemy complex of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lep., Lymantriidae) in different phases of its population dynamics in eastern Austria and Slovakia – a comparative study. *Journal of Applied Entomology* 125, 217-227.

Hoch, G., Kalbacher, G., Schopf, A. (2006): Gypsy moth revisited: studies on the natural enemy complex of *Lymantria dispar* L. (Lep., Lymantriidae) during an outbreak in a well known gypsy moth area. *Mitteilungen der deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie* 15, 201-204.

Hoch, G., D'Amico, V., Solter, L. F., Zubrik, M., McManus, M. L. (2008): Quantifying horizontal transmission of *Nosema lymantriae*, a microsporidian pathogen of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (Lep., Lymantriidae) in field cage studies. *Journal of Invertebrate Pathology* 99, 146-150.

Inglis, G. D., Johnson, D. L., Goettel, M. S. (1995): Effects of simulated rain on the persistence of *Beauveria bassiana* conidia on leaves of alfalfa and wheat. *Biocontrol Science and Technology* 5, 365-369.

Inyang, E. N., McCartney, H. A., Oyejola, B., Ibrahim, L., Pye, B., J., Archer, S., A., Butt, T. M. (2000): Effect of formulation, application and rain on the persistence of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae* on oilseed rape. *Mycological Research* 104, 653-661.

Joseph, J., Vemuganti, G. K., Sharma, S. (2005): Microsporidia: emerging ocular pathogens. *Indian Journal of Medical Microbiology* 23, 80-91.

Keeling, P. J., McFadden, G. I. (1998): Origins of microsporidia. *Trends in Microbiology* 6, 19-23.

Keeling, P. J., Fast, N. M. (2002): Microsporidia: biology and evolution of highly reduced intracellular parasites. *Annual Review of Microbiology* 56, 93-116.

Kenis, M., Vaamonde, C. L. (1998): Classical biological control of the gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.), in North America: Prospects and new strategies. In: McManus, M. L., Liebhold, A. M., *Proceedings: Population Dynamics, Impacts, and Integrated Management of Forest Defoliating Insects*. USDA Forest Service General Technical Report NE-247, S. 213-221.

Lechowicz, M. J., Mauffette, Y. (1986): Host preferences of the gypsy moth in eastern North America versus European forests. *Revue d'Entomologie du Québec* 31, 43-51.

Liebhold, A., Elkinton, J., Williams, D., Muzika, R.-M. (2000): What causes outbreaks of the gypsy moth in North America?. *Population Ecology* 42, 257-266.

Lobinger, G., Skatulla, U. (2001): Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit und Entwicklung der Larven zweier Herkünfte des Schwammspinners *Lymantria dispar* L. (Lep.: Lymantriidae) in Abhängigkeit von der Fraßpflanze. *Anzeiger für Schädlingskunde / Journal of Pest Science* 74, 89-93.

Maddox, J. V., McManus, M. L., Solter, L. F. (1998): Microsporidia affecting forest Lepidoptera. In: McManus, M. L., Liebhold, A. M., *Proceedings: Population Dynamics, Impacts, and Integrated Management of Forest Defoliating Insects*. USDA Forest Service General Technical Report NE-247, S.187-197.

Maddox, J.V., Baker, M.D., Jeffords, M.R., Kuras, M., Linde, A., Solter, L.F., McManus, M.L., Vavra, J., Vossbrinck, C.R. (1999): *Nosema portugal*, N. SP., isolated from gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) collected in Portugal. *Journal of Invertebrate Pathology* 73, 1-14.

Mathis, A., Deplazes, P., Weber, R. (2002): Mikrosporidien: intrazelluläre Eukaryoten und opportunistische Krankheitserreger. *Denisia* 6, 265-270.

McManus, M. L., Maddox, J. V., Jeffords, M. R., Webb, R. E. (1989): Evaluation and selection of candidate European microsporidia for introduction into U.S. gypsy moth populations. In: Wallner, W. E., McManus, K. A., *Proceedings Lymantriidae: A Comparison of Features of New and Old World Tussock Moths*. USDA Forest Service General Technical Report NE-123, S.455-468.

McManus, M. L., Solter, L. (2003): Microsporidian pathogens in European gypsy moth populations. In: McManus, M. L., Liebhold, A. M., *Proceedings: Ecology, Survey and Management of Forest Insects*. September 1-5, 2002. Krakow, Poland. USDA Forest Service General Technical Report NE-311, S.44-51.

Nägeli, K. (1857): Ueber die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. Bot. Zeitung 15, 760-761.

Nierhaus-Wunderwald, D., Wermelinger, B. (2001): Der Schwammspinner (*Lymantria dispar* L.). Merkblatt für die Praxis 34, 8 S.

Pollan, S. (2009): Effect of temperature on development of the microsporidium *Nosema lymantriae* and disease progress in the host *Lymantria dispar*. Masterarbeit, Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz, Universität für Bodenkultur Wien.

Scheid, P. L. (2007): Untersuchungen zum Invasionsweg und zum Wirtsspektrum bei freilebenden Amöben: Ein aus *Vanella* sp. isolierter Mikrosporidien-ähnlicher Endozytobiont als intranukleärer Endoparasit. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Sprague, V. (1976): Classification and phylogeny of the Microsporidia. In: Bulla, L. A., Cheng, T. C. (Hrsg.), Comparative Pathobiology, Vol.2. Plenum Press, New York, S. 1-30.

Sprague, V., Becnel, J. J. (1998): Note on the name-author-date combination for the taxon MICROSPORIDIES Balbiani, 1882, when ranked as a phylum. Journal of Invertebrate Pathology 71, 91-94.

Van de Peer, Y., Ali, A. B., Meyer, A. (2000): Microsporidia: accumulating molecular evidence that a group of amitochondriate and suspectedly primitive eukaryotes are just curious fungi. Gene 246, 1-8.

Vávra, J., Larsson, J. I. R. (1999): Structure of the microsporidia. In: Wittner, M. und Weiss, L. M. (Hrsg.), The Microsporidia and Microsporidiosis. ASM Press, Washington, D.C., S. 7-84.

Vossbrinck, C. R., Maddox, J. V., Friedman, S., Debrunner-Vossbrinck, B. A., Woese, C. R. (1987): Ribosomal RNA sequence suggest microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature* 326, 411-414.

Weiser, J. (1957): Mikrosporidien des Schwammspinners und des Goldafters. *Zeitschrift für angewandte Entomologie* 40, 509-527.

Weiser, J. (1998): Pathogens of the gypsy moth in Central Europe: Host range and interactions. In: McManus, M. L., Liebhold, A. M., Proceedings: Population Dynamics, Impacts, and Integrated Management of Forest Defoliating Insects. USDA Forest Service General Technical Report NE-247, S. 322-333.

Wellenstein, G., Schwenke, W. (1978): *Lymantria dispar* L., Schwammspinner. In: Schwenke, W. (Hrsg.), Die Forstschädlinge Europas, Band 3: Schmetterlinge, P. Parey, Hamburg und Berlin, S. 335-349.

Wittner, M. (1999): Historic perspective on the microsporidia: expanding horizons. In: Wittner, M. und Weiss, L. M. (Hrsg.), The Microsporidia and Microsporidiosis. ASM Press, Washington, D.C., S. 1-6.

Wulf, A. (1996): Resümee aktueller Erkenntnisse aus den jüngsten Schmetterlingskalamitäten im Forst. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft 322, 239-244.

Zwölfler, W. (1927): Die Pebrine des Schwammspinners (*Porthetria dispar* L.) und Goldafters (*Nygmia phaeorrhoea* Don. = *Euproctis chrysorrhoea* L.), eine neue wirtschaftlich bedeutungsvolle Infektionskrankheit. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 12, 498-500.