

Einfluss einer Mikrosporidieninfektion (*Vairimorpha disparis*) auf  
den Juvenilhormon-Haushalt von *Lymantria dispar*

Masterarbeit der Studienrichtung Phytomedizin  
an der Universität für Bodenkultur Wien

vorgelegt von

Julia Karlhofer, BSc.

Wien

Juli 2011

Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz  
Universität für Bodenkultur Wien

## Danksagung

Ohne fachliche Hilfe und technische Unterstützung lieber Menschen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Meine Masterarbeit entstand am Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz der BoKu Wien unter der Leitung von Dr. Gernot Hoch und Dr. Christa Schafellner, bei denen ich mich herzlich für die Betreuung und die daraus resultierenden zahlreichen fachlichen Gespräche, Ratschläge und Hilfestellungen bei Problemfällen, sowie für die Bereitstellung von Geräten und Analysemitteln bedanken möchte.

Ein weiteres herzliches Dankeschön gebührt Gabi Motlik, Andrea Stradner und Peter Kritsch, die immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatten und mir nicht nur in praktischer Hinsicht eine große Hilfe bei der Durchführung meines Projektes waren.

*Ein Dankeschön auch all denen, die durch ihre moralische Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen, hier aber nicht namentlich erwähnt wurden.*

*Für Sandra.*

# Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	I
Inhaltsverzeichnis .....	II
Tabellenverzeichnis .....	III
Abbildungsverzeichnis .....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
Zusammenfassung .....	VII
Abstract .....	VIII
1. Einleitung .....	1
1.1. Fragestellung .....	1
1.2. <i>Lymantria dispar</i> .....	3
1.3. Biologische Schädlingsbekämpfung von <i>Lymantria dispar</i> .....	6
1.4. Mikrosporidien .....	8
1.4.1. <i>Vairimorpha disparis</i> .....	10
1.5. Juvenilhormone .....	12
1.6. Juvenilhormon-Esterasen .....	15
2. Material und Methoden .....	18
2.1. Insekten und Pathogene .....	18
2.2. Versuchsaufbau .....	18
2.2.1. Sporengewinnung für Infektionen .....	18
2.2.2. Zucht der Schwammspinnerraupen .....	19
2.2.3. Infektion von <i>L. disparis</i> .....	19
2.2.4. Hämolymp-Probengewinnung .....	20
2.2.5. Messung der JH-Esterase-Aktivität mittels Partition Assay .....	21
2.2.6. JH-Extraktion und Derivatisierung .....	24
a. Isooktan-Extraktion .....	25
b. Aufreinigung über Aluminiumoxid-Röhrchen .....	25
c. Methoxy-Derivatisierung .....	26
d. Aufreinigung über Aluminiumoxid-Röhrchen .....	26
e. Silylieren mit nona-fluoro-hexyl-dimethyl-chlorsilan .....	26
f. Filtration über Aluminiumoxid-Röhrchen .....	27
g. Aufreinigung über Aluminiumoxid-Röhrchen .....	27
h. Probenaufbewahrung für GC-MS .....	27
2.3. Messung am GC-MS .....	28
2.4. Statistische Auswertung .....	30
3. Ergebnisse .....	31
3.1. Infektionszustand der infizierten Schwammspinner-Raupen .....	31
3.2. Raupengewichte bei infizierten und gesunden Tieren .....	34
3.3. Juvenilhormon-Esterase Aktivität .....	36
3.4. Juvenilhormonmessungen .....	40
4. Diskussion .....	47
5. Literatur .....	56

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalien für die JH-Extraktion und Derivatisierung .....	24
Tabelle 2: Überblick über die Retentionszeiten der JH und der Standards (JH III E, JH II E, JH I E) .....	28
Tabelle 3: Mittelwerte ( $\pm$ Standardfehler) der Frischgewichte infizierter Raupen und Kontrolltiere, getrennt nach dem Larvenstadium zum Zeitpunkt der Probennahme. Signifikante Unterschiede ( $P < 0,05$ ) laut Kruskal-Wallis Test sind durch Sternchen (*) markiert. ....	35
Tabelle 4: Mittelwerte (MW), Stichprobenumfang (n) und Standardfehler der ersten beiden JH III-Titer Messreihen im Überblick. ....	42
Tabelle 5: Mittelwerte (MW), Stichprobenumfang (n), Larvenstadien und Standardfehler der 3. JH III-Titer- Messreihe im Überblick. An den mit x gekennzeichneten Tagen wurden keine Messungen durchgeführt. ....	45
Tabelle 6: Übersicht über die Ergebnisse der statistischen Auswertungen. Bei allen Messungen wurde mittels H-Test getestet, außer bei JH-Titer Ansatz I+II, bei dem der U-Test verwendet wurde (2 Gruppen). An den mit x gekennzeichneten Tagen wurde keine Untersuchung vorgenommen. n.s. = Testergebnis nicht signifikant. ....	46

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die ältere Schwammspinner-Larve ist grau und trägt auf jedem Körpersegment zwei Warzen, die auf den ersten fünf Segmenten blau bis violett, auf den restlichen rot sind. .....	3
Abbildung 2: Eigelege des Schwammspinners aus der Zucht des USDA/APHIS Otis Method Development Center .....	5
Abbildung 3: Primärsporen von <i>Vairimorpha disparis</i> .....	11
Abbildung 4 a + b: Oktosporen und sporophore Vesikel (links) und zweikernige Dauersporen (rechts) können ca. 1 Woche nach der Infektion im Fettkörper der Raupen gefunden werden. .....	12
Abbildung 5: Chemische Struktur der drei Juvenilhormon-Homologen in Lepidopteren (aus Gilbert, 1976).....	14
Abbildung 6: Die Rolle von Juvenilhormonen in Insekten (nach Pearson, 2010) .....	14
Abbildung 7: Möglichkeiten einer Juvenilhormon-Inaktivierung (aus Nussbaumer, 1998) ....	16
Abbildung 8: Zählkammer nach Neubauer .....	19
Abbildung 9: Infektion der Schwammspinner am ersten Tag des L4 in Zellkulturplatten.....	20
Abbildung 10: Umsatz von JH III durch die JH-Esterase zu JH-Säure .....	22
Abbildung 11: Die Proben wurden aliquotiert und mit JH III als Substrat für die Enzymreaktion versetzt.....	22
Abbildung 12: Scintillationszähler Tri-Carb 2500 TR zur Messung der Enzymaktivität .....	23
Abbildung 13: Überblick über die JH-Extraktion und Derivatisierung .....	24
Abbildung 14: Abblasen des Lösungsmittels im Heliumstrom.....	26
Abbildung 15: Vermischen der Proben mit Pyridin und anschließende Filtration. ....	27
Abbildung 16: (a) JH III, (b) JH I, (c) Umesterung einer Methylestergruppe zu einer Ethylestergruppe. Aus dieser Umesterung resultieren die als interne Standards verwendeten Moleküle JH III E und JH I E. ....	28
Abbildung 17: GC-MS von Agilent (GCD) mit automatischem Probengeber.....	29
Abbildung 18: Anfangsstadium der Infektion an 5 dpi. Wenige Primärsporen waren im Fettkörper und der Spinndrüse zu sehen.....	32
Abbildung 19: Infektionszustand 8 – 10 dpi: Es konnten Primärsporen und diplokaryotische Dauersporen gefunden werden, sowie vereinzelt sporophore Vesikel und Merontenstadien. .....	32
Abbildung 20: 10 – 12 dpi wurden starke Infektionen beobachtet. Primärsporen, diplokaryotische Dauersporen und Oktosporen in sporophoren Vesikeln waren in großer Zahl vorhanden. ....	33
Abbildung 21: 10 dpi war der Fettkörper durch die Mikrosporidieninfektion bereits stark angegriffen und wirkte im Phasenkontrast nicht mehr glänzend. Massen von diplokaryotischen Dauersporen sowie Oktosporen in sporophoren Vesikeln waren zu beobachten. ....	33
Abbildung 22: Merontenstadien konnten an den meisten Tagen gefunden werden. ....	34
Abbildung 23: Nicht infiziertes bzw. nicht beeinträchtigt Fettkörper-Quetschpräparat zum Vergleich.....	34
Abbildung 24: Frischgewichte (Mittelwerte $\pm$ Standardfehler) der gesunden und mit <i>V. disparis</i> infizierten Tiere. Stichprobenumfang siehe Tabelle oben. Der türkise Datenpunkt an 14 dpi kennzeichnet die Kontrolltiere, die sich ins Präpuppenstadium gehäutet hatten und paarweise gegen die anderen Gruppen getestet wurden. ....	35

Abbildung 25: Aktivität der JH-Esterase (Mittelwerte $\pm$ Standardfehler; nmol JH III/ml*min) in der Hämolymphe infizierter und nicht-infizierter Raupen. Der Pfeil zeigt die Häutung der Kontrollraupen an. Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede laut Kruskal Wallis H-Test ( $p < 0,05$ ). Unterschiedliche Buchstaben deuten auf signifikante Unterschiede (post hoc paarweise U-Tests) innerhalb eines Tages.....	37
Abbildung 26: Das Scatterplot Diagramm von 10 dpi zeigt die Unterschiede in den Aktivitäten der JH-Esterase der Raupen und deren Frischgewicht. ....	38
Abbildung 27: Aktivitäten der JH-Esterase der zweiten Messreihe mit größerer Probenanzahl ( $n=10$ ). Der Pfeil kennzeichnet die Häutung der Kontrolltiere ins L5. Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, gezeigt durch den Kruskal Wallis H-Test ( $p < 0,05$ ). Unterschiedliche Buchstaben deuten auf signifikante Unterschiede (post hoc paarweise U-Tests) innerhalb eines Tages.....	39
Abbildung 28 a + b: Die Scatterplot Diagramme von 12 dpi und 14 dpi zeigen die Unterschiede in den Aktivitäten der JH-Esterase der Raupen und deren Frischgewicht.....	40
Abbildung 29 : Chromatogramm einer gepoolten Hämolympheprobe aus Kontrollraupen 5 dpi. Bei den Retentionszeiten von 10,3 und 10,7 min kann man die Peaks der JH-Ethylstandards erkennen. Das in der Hämolymphe gefundene JH III erscheint bei einer Retentionszeit von 10,1 min. ....	41
Abbildung 30: Übersicht über die Ergebnisse der JH III-Messungen der ersten beiden Ansätze. Der Pfeil kennzeichnet die Häutung der Kontrolltiere. Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede, laut Mann Whitney U-Test ( $p < 0,05$ ). ....	42
Abbildung 31: Chromatogramm einer Probe der 3. JH-Messreihe. Diese Probe stammt von einer mit <i>V. disparis</i> infizierten Einzelraupe im L4, 10 dpi.....	44
Abbildung 32: Ergebnis der 3. JH-Messreihe mit Einzeltieren. Der Pfeil kennzeichnet die Häutung der Kontrolltiere. ....	45
Abbildung 33 a + b: Scatterplot-Diagramme der JH-Einzelraupen-Titerbestimmung Ansatz III und deren Frischgewicht 8 dpi und 12 dpi.....	46

## Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
C	Kontrolltiere
dpi	Tage nach der Infektion, days post infection
Min	Minuten
N <sub>2</sub>	Stickstoff
DR	Derivatisierungsgefäße aus Glas
GC-MS	Gaschromatograph gekoppelt mit Massenspektrometer
I	Infizierte Tiere
JH	Juvenilhormon, Juvenilhormone
JH-Esterase	Juvenilhormon-Esterase
L5	Fünftes Larvenstadium
L4	Viertes Larvenstadium
L3	Drittes Larvenstadium
MeOH	Methanol
TFA	Trifluoressigsäure

## Zusammenfassung

Manche parasitische Organismen steuern die Entwicklung ihres Wirtes, indem sie dessen Juvenilhormongehalt beeinflussen und damit eine Weiterentwicklung des Wirtstieres verzögern. Auch bei einer Mikrosporidieninfektion kann eine verlängerte Entwicklungsdauer infizierter Larven auftreten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob ein Einfluss der virulenten Mikrosporidie *Vairimorpha disparis* auf den Juvenilhormon-Metabolismus von *Lymantria dispar* (Lepidoptera, Lymantriidae) vorliegt, der Grund dieser Entwicklungsstörung sein könnte. Dazu wurden die Aktivität der Juvenilhormon-Esterase mittels eines Partition-Assays und der Juvenilhormontiter mittels GC-MS in der Hämolymphe von mit *Vairimorpha disparis* infizierten Raupen im Verlauf einer Infektion gemessen und mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Es konnten ab 5 Tage nach der Infektion signifikant leichtere Frischgewichte bei infizierten Larven festgestellt werden. Die Aktivität der Juvenilhormon-Esterase infizierter Tiere war bereits ca. eine Woche nach der Infektion signifikant niedriger als bei den Kontrolltieren. In zwei Versuchsansätzen konnten im Vergleich zur Kontrollgruppe von Tag 8 bis Tag 14 nach der Infektion signifikant verringerte Aktivitäten des Enzyms in den infizierten Tieren im 4. und 5. Larvenstadium gemessen werden. Bei der Juvenilhormon-Bestimmung gepoolter Hämolympheproben konnten am 8. (360,4 ± 45,6 pg/ml bei infizierten Tieren und 176,8 ± 26,8 pg/ml bei Kontrollen) und am 10. Tag (490,5 ± 80,6 pg/ml bei infizierten Tieren und 21,7 ± 32,5 pg/ml bei Kontrollen) nach der Infektion signifikant höhere Juvenilhormon-Titer bei infizierten Tieren gefunden werden, wobei am Tag 10 noch alle infizierten Tiere im 4., die Kontrollen dagegen schon zum Teil im 5. Larvenstadium waren. Juvenilhormontitermessungen von Einzeltieren lieferten allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen infizierten und gesunden Tieren. Wahrscheinlich hat *V. disparis* einerseits durch die hohen Energieansprüche im Wirt eine hungerähnliche Situation ausgelöst und andererseits den Fettkörper und dessen Funktionen beschädigt. Die verringerte Aktivität der Juvenilhormon-Esterase in der Hämolymphe kann die Folge sein, wodurch das Juvenilhormon nicht mehr vollständig abgebaut wird.

## Abstract

### Effects of a microsporidian infection (*Vairimorpha disparis*) on the juvenile hormone metabolism of *Lymantria dispar* larvae

Some parasitic organisms regulate their insect hosts' development by influencing its juvenile hormone metabolism. Consequently the hosts' development is delayed. Infections with microsporidia can also cause a prolonged development of infected host larvae. In the present study we tested if *V. disparis* can likewise interact with the juvenile hormone metabolism of its host, which seems to cause these developmental disorders.

Therefore, juvenile hormone titre in the hemolymph as well as the activity of juvenile hormone esterase of infected larvae were measured and compared to uninfected controls. Juvenile hormone was analyzed by GC-MS, juvenile hormone esterase activity was determined in partition assays using tritium-labelled juvenile hormone as substrate.

Beginning with the fifth day after infection, the fresh weight of infected larvae was significantly lower than of controls. Two experimental approaches showed, that from 8 to 14 days after infection, the activity of the juvenile hormone esterase is significantly decreased. The measurement of JH III-titres of pooled hemolymph-samples showed significant differences on day 8 ( $360.4 \pm 45.6$  pg/ml infected larvae and  $176.8 \pm 26.8$  pg/ml in controls) and day 10 ( $490.5 \pm 80.6$  pg/ml in infected larvae and  $21.7 \pm 32.5$  pg/ml in controls) after infection. Individual measurements of the larvae showed no significantly increased hormone titres. Presumably this is due to *V. disparis*' high energy demands from its host that causes symptoms of starvation. Furthermore, the fatbody of the larvae is severely damaged. This might result in a lower activity of the juvenile hormone esterase in the hemolymph of infected larvae; consequently the juvenile hormone is not degraded completely.

Key words: microsporidia, juvenile hormone, juvenile hormone esterase, *Lymantria dispar*, pathogen-host interactions

# 1. Einleitung

## 1.1. Fragestellung

Viele parasitische Organismen, wie z. B. koinobionte Endoparasitoide oder intrazellulär lebende Mikroorganismen, sind in ihrer Entwicklung von einem Wirtsorganismus abhängig, der sich noch einige Zeit weiter entwickeln kann (Edwards et al., 2001; Dettner et al., 1999). Entsprechend fein abgestimmte Wechselwirkungen zwischen Wirt und Parasit sind dazu erforderlich. Oft ist es für eine erfolgreiche Entwicklung von Endoparasitoiden nötig, die Metamorphose des Wirtes zu verhindern (Edwards et al., 2001). Gut untersucht sind diese Wechselwirkungen z. B. beim Schwammspinner und der gregären, endoparasitischen Brackwespe *Glyptapantheles liparidis*. Diese Wespen entwickeln sich über zwei endoparasitische Stadien in Larven des Schwammspinners *Lymantria dispar*. Dabei nehmen die Parasitoide auch Einfluss auf das endokrine System des Wirtes (Schafellner et al., 2007; Schafellner et al., 2004; Hoch et al., 2002; Hoch und Schopf, 2001).

Bei der Regulation von Häutung und Metamorphose von holometabolen Insekten spielen Häutungshormone (Ecdysteroide) und Juvenilhormone (Sesquiterpene) zusammen. In Larvalstadien sind Juvenilhormone hauptsächlich für die Aufrechterhaltung des larvalen Charakters verantwortlich. Sie werden in den Corpora allata von Insekten gebildet und in der Hämolymphe hauptsächlich vom Enzym Juvenilhormon-Esterase abgebaut (Edwards et al., 2001; Spindler, 1999; de Kort und Granger, 1981). Bei vielen Parasitoiden konnte gezeigt werden, dass diese den Titer der Juvenilhormone in ihren Lepidopteren-Wirten erhöhen (Edwards et al., 2001). Die Verhinderung der Metamorphose beim Schwammspinner durch die parasitischen Wespen geschieht offensichtlich durch eine aktive, dramatische Erhöhung des Juvenilhormon-Titers in den parasitierten Larven (Schafellner et al., 2004). Dies hat zur Folge, dass die normale Häutung und Metamorphose der befallenen Tiere verhindert wird und die Parasitoide ihren Wirt vollentwickelt verlassen können. Weiters weisen parasitierte Larven eine geringere Juvenilhormon-Esterase-Aktivität auf (Schafellner et al., 2007). In unparasitierten, sich normal entwickelnden Larven führt die Aktivität der Juvenilhormon-Esterase zum Abbau des vorhandenen Juvenilhormons und ermöglicht so, gemeinsam mit dem Häutungshormon Ecdyson, die Häutung ins nächste Larvalstadium (Schafellner et al., 2004; Eggert et al., 1999; Nussbaumer, 1998; Edwards et al., 2001).

Auch Mikrosporidien wie *Vairimorpha disparis* weisen eine parasitische Lebensweise auf, bei der sie während des gesamten Entwicklungszyklus von ihrem Wirt abhängig sind und diesen in seiner erfolgreichen Entwicklung und seinem Wachstum beeinträchtigen (für *V. disparis* siehe Hoch und Schopf, 2001). Es wäre vorstellbar, dass solche Pathogene auch auf die Endokrinologie ihres Wirtes Einfluss nehmen, um so dessen Entwicklung zu ihrem eigenen Vorteil zu manipulieren. Schon 1962 stellten erste Untersuchungen mit einer *Nosema*-Art eine Verbindung zwischen den Symptomen der Mikrosporidieninfektion mit einem möglicherweise erhöhten Juvenilhormongehalt in den Wirtsinsekten her (Fisher und Sanborn, 1962). Erstmals zeigten Untersuchungen von Down et al. (2008), dass eine Infektion von *Lacanobia oleracea* (Gemüseeeule) mit *Vairimorpha necatrix*, einem ebenfalls sehr aggressiven Mikrosporidium, die Entwicklungszeit der Larven verlängert, und dass tatsächlich der Juvenilhormon-Gehalt in den späteren Larvenstadien deutlich erhöht ist. Dadurch kann sich eine infizierte Larve nicht normal entwickeln und verpuppen. Es könnte von Vorteil für die Mikrosporidien sein, die Entwicklung ihres Wirtes so hinauszuzögern. Eine Erhöhung des Juvenilhormongehalts der Raupen könnte für die Mikrosporidien adaptiv sein und die Reproduktionsfitness verbessern (Down et al, 2008).

Ein Eingriff in den Juvenilhormon-Metabolismus des Wirts wäre bei Mikrosporidien grundsätzlich auf der Ebene des Abbaus der Juvenilhormone möglich. Eine Infektion mit der aggressiven Mikrosporidie *V. disparis* hat hoch signifikante Auswirkungen auf Kohlenhydrat- und Lipidgehalte der Wirtsraupen (Hoch et al., 2002). Es ist denkbar, dass diese ihren Wirt auf anderer Ebene, nämlich durch Störung des Juvenilhormon-Metabolismus, beeinflusst. Außerdem wäre ein Einfluss des Pathogens auf die Juvenilhormon-Synthese denkbar, um den Titer des Wirtstieres zu verändern. Fisher und Sanborn (1962) vermuteten sogar, dass Mikrosporidien Substanzen mit JH-Aktivität produzieren und an ihren Wirt abgeben. Mikrosporidien könnten unter Umständen die Endokrinologie des Wirtes aktiv beeinflussen, z. B. über Manipulation der Juvenilhormon-Esterasen (Siehe Kapitel 1. 6). Die Erhöhung des Juvenilhormongehalts durch eine Aktivitätsminderung der JH-Esterasen kann aber auch eine Folge der Zerstörung des Fettkörpers des Wirts durch die Mikrosporidien sein, welches eine passive Beeinflussung des Juvenilhormon-Metabolismus wäre.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu zeigen, ob eine Infektion mit *Vairimorpha disparis* Einfluss auf den Juvenilhormon-Titer von Schwammspinnerlarven hat. Weiters sollte

ermittelt werden, ob durch einen *Vairimorpha disparis*-Befall die Juvenilhormon-Esterase-Aktivität in der Hämolymphe der Raupen vermindert wird.

## 1.2. *Lymantria dispar*

Der Schwammspinner, *Lymantria dispar*, wurde erstmalig von Linnaeus 1758 unter dem Namen *Phalaena (Bombyx) dispar* beschrieben (Doane und McManus, 1981; Forbush und Fernald, 1896); er gehört zur Familie der Lymantriidae (Trägspinner, Abbildung 1). Weibliche Falter sind flugträge, größer und heller als die Männchen (Nierhaus-Wunderwald und Wermelinger, 2001; Doane and McManus, 1981; Wellenstein und Schwenke, 1978).

Sein natürliches Verbreitungsgebiet erstreckt sich von Nordafrika (Mittelmeerküstenländer) über West- Süd- und Mitteleuropa und über Russland bis nach Japan. In Mitteleuropa findet sich der Schwammspinner verstärkt in Regionen mit Trockenzeiten und an wärmeren Standorten, das trockenere und wärmere Klima begünstigt außerdem seine Massenvermehrungen (Klein, 2007; Hoch, 1995; Wellenstein und Schwenke, 1978). Die Mittelmeerländer und die Balkanregion gelten als Verbreitungsschwerpunkt. In Mitteleuropa treten Massenvermehrungen in einem Gradationszyklus von sieben bis zehn Jahren auf (Kalbacher, 2008; Klein, 2007; Nierhaus-Wunderwald und Wermelinger, 2001). In Österreich war die letzte Massenvermehrung 2003-2005 im Burgenland zu beobachten (Kalbacher, 2008).



**Abbildung 1:** Die ältere Schwammspinner-Larve ist grau und trägt auf jedem Körpersegment zwei Warzen, die auf den ersten fünf Segmenten blau bis violett, auf den restlichen rot sind.

Da der Schwammspinner trotz einer hohen Anzahl an natürlichen Gegenspielern zu Massenvermehrungen neigt, macht ihn das in vielen Ländern zu einem wichtigen Forstschädling (Forbush und Fernald, 1896). Es gibt Beobachtungen über viele großflächige Schwammspinner-Ausbrüche in Europa, Asien und Nordafrika (Doane und McManus, 1981). *L. dispar* wurde 1869 von L. Trouvelot, einem französischen Entomologen, nach Amerika (Medfort, Massachusettes) gebracht, allerdings ohne seine natürlichen Feinde (Parasiten,

Räuber, Pathogene) (Leonard, 1981; Forbush und Fernald, 1896). Starker Raupenfraß führt in den USA seit 1889 in Laubholzbeständen aller Altersstufen und auch Obstanlagen zu erheblichen Blattverlusten (Nierhaus-Wunderwald und Wermelinger, 2001; Hajek, 1999; Schwerdtfeger, 1970; Forbush und Fernald, 1896). Schon Linnaeus (1757) beschrieb den Schwammspinner als äußerst polyphag, in den USA soll er 400 Pflanzenarten, hauptsächlich Laubbaumarten, befressen. Allerdings unterscheiden sich unterschiedliche Populationen bezüglich ihrer Wirtspflanzenpräferenzen. Vorzugspflanzen sind in Mitteleuropa die *Quercus*-Arten. Auf weniger bevorzugte Laubhölzer sowie Nadelholzarten weicht der Schwammspinner nur bei Nahrungsmangel aus, da die erfolgreiche Entwicklung weiterer Generationen durch die schlechte Nahrungsqualität gestört sein kann, junge Raupen sterben ab (Klein, 2007; Nierhaus-Wunderwald und Wermelinger, 2001; Doane und McManus, 1981; Schwerdtfeger, 1970; Wellenstein und Schwenke, 1978; Kurir, 1953). In den USA befrisst der Schwammspinner bevorzugt *Quercus* sp., *Fagus* sp., *Betula* sp. und *Acer* sp. (Leonard, 1981; Barbosa, 1978). In „Normaljahren“ ohne Massenvermehrung befrisst der Schwammspinner im Allgemeinen nur seine Vorzugspflanzen (Wellenstein und Schwenke, 1978). Je weiter der Blattverlust vorangeht, desto weniger selektiv werden die Larven bezüglich ihrer Wirtspflanzen (Barbosa, 1978). Im Falle einer Massenvermehrung kann der Schwammspinner auch ein gesellschaftliches Problem werden, wenn er sich auf Wohngebiete ausbreitet und den Menschen belästigt. Es reagieren allerdings nur wenige empfindliche Personen allergisch auf die Haare des Schwammspinners, da es sich nicht wie bei Prozessionsspinner-Arten um Giftthaare handelt (Nierhaus-Wunderwald und Wermelinger, 2001).

### ***Lebenszyklus des Schwammspinners***

Das Weibchen legt seine kleinen, kugeligen Eier in der Natur am Stamm oder an den Astunterseiten ab (Doane and McManus, 1981; Wellenstein und Schwenke, 1978). Sie werden in Clustern von ungefähr 400-1000 Stück abgelegt, abhängig von dem Nahrungsangebot und der Gradationsphase (Nierhaus-Wunderwald und Wermelinger, 2001; Wellenstein und Schwenke, 1978) (Abbildung 2). Das Weibchen überzieht das Eigelege mit Haaren von ihrem Abdomen (Forbush und Fernald, 1896).



**Abbildung 2:** Eigelege des Schwammspinners aus der Zucht des USDA/APHIS Otis Method Development Center

Die Larve schlüpft im Frühling (April, Mai) (Nierhaus-Wunderwald und Wermelinger, 2001). Die männlichen Raupen häuten sich typischerweise vier- bis fünf-, die weiblichen vier- bis sechsmal (Abbildung 1; Wellenstein und Schwenke, 1978). Bevor sich die Raupen häuten, ruhen sie ungefähr einen Tag lang. Nach etwa einer Stunde ist der Häutungsprozess mit dem Abstoßen der alten Kopfkapsel beendet (Forbush und Fernald, 1896). Alle Raupenstadien verfügen über ein Spinnvermögen, das auch für die Ausbreitung der jungen Raupen bedeutsam sein kann (Leonard, 1981; Wellenstein und Schwenke, 1978; Forbush und Fernald, 1896). Wenn die Raupen ausgewachsen sind, verspinnen sie sich in ein lockeres Gespinst. Die Puppenruhe dauert zwei bis drei Wochen (Nierhaus-Wunderwald und Wermelinger, 2001; Forbush und Fernald, 1896). Der Schwammspinner bildet nur eine Generation im Jahr aus, die fertig entwickelten Räumchen überwintern in der Eihülle (Nierhaus-Wunderwald und Wermelinger, 2001).

### ***Der Gegenspielerkomplex des Schwammspinners***

Für den Schwammspinner sind über 170 Antagonisten aus ganz unterschiedlichen systematischen Gruppen bekannt (Wellenstein und Schwenke, 1978). Die Bedeutung des Gegenspielerkomplexes auf den Schwammspinner als Pflanzenschädling lässt sich durch seine alleinige Einbringung und dessen verursachte Schäden in Nordamerika zeigen (Nierhaus-Wunderwald und Wermelinger, 2001; Leonard, 1981).

Als Gegenspieler im Heimatgebiet sind Prädatoren wie der Kuckuck, *Cuculus* sp., oder Laufkäfer, wie z.B. *Calosoma inquisitor* und *Calosoma sycophanta*, bedeutende Mortalitätsfaktoren. Es gibt zahlreiche Parasitoide, die unterschiedliche Stadien von *L. dispar* parasitieren und für mitunter bedeutende Mortalität sorgen können, z. B. Braconidae wie *Glyptapanteles liparidis*, *Cotesia melanoscela* oder *Glyptapantheles porthetriae*, Tachinidae wie *Parasetigena sylvestris* und *Blepharipa pratensis* oder Ichneumonidae wie *Phobocampe* spp. (Klein, 2007; Hoch et al., 2001; Reardon, 1981).

Mikroorganismen und Viren können einen erheblichen Einfluss auf die Populationsdynamik ihrer Insektenwirte ausüben (Anderson und May, 1981). Es gibt zahlreiche Beispiele dafür, dass Pathogene Gradationen von Schadinsekten zum Einbruch bringen können (Wegensteiner, 2003; Zwölfer, 1999; Doane, 1970). Der Schwammspinner ist Wirt für viele verschiedene Pathogene: Baculoviren, Bakterien, Mykosen und Mikrosporidien (McManus und Solter, 2003; Hoch et al., 2001; Leonard, 1981). Die wichtigsten Pathogene bei *L. dispar* sind Kernpolyederviren (NPV), die einen hohen Prozentsatz der Larvenpopulation töten und damit eine Massenvermehrung einbrechen lassen können (McManus und Solter, 2003; Campbell, 1981). Viren wirken generell stark reduzierend auf Massenvermehrungen von *L. dispar* (Wellenstein und Schwenke, 1978). Auch Mikrosporidien können in manchen Fällen Mortalitätsfaktoren sein, nehmen aber meist eine eher untergeordnete Stellung ein. Es gibt allerdings auch einige Berichte über eine sehr hohe Prävalenz von Mikrosporidien in *L. dispar*-Populationen, die eine Rolle im Massenwechsel spielen könnten (McManus und Solter, 2003).

### ***1.3. Biologische Schädlingsbekämpfung von *Lymantria dispar****

Bei der biologischen Schädlingskontrolle werden spezifische natürliche Feinde wie Räuber, Parasitoide und Pathogene eingesetzt, um den Schädling durch eine starke Reduktion seiner Population unter Kontrolle zu halten und Schäden abzuwenden (Beddington et al., 1978; Schwertfeger, 1970). Da die chemische Schädlingsbekämpfung nachteilige Auswirkungen auf Umwelt und Menschen mit sich bringen kann, steigt das Interesse an biologischen Schädlingsbekämpfungsmitteln, um negative Folgen so weit wie möglich vermeiden zu können (Encyclopedia, 2002). Trotz chemischer Bekämpfung hat sich der Schwammspinner in den USA etabliert (Wegensteiner, 2003). Gegenspieler des Schwammspinners zur Kontrolle der Fraßschäden in Populationen einzuführen, wurde als ein wichtiger Weg gesehen, den Schädling zu regulieren (Reardon, 1981). In den USA wurden bereits zahlreiche Versuche zur Bekämpfung des Schwammspinners mittels klassischer biologischer Schädlingsbekämpfung gestartet: Viele Parasitoide (z. B. *Phobocampe disparis*, *Compsilura concinnata*, *Blepharipa pratensis*) sowie Prädatoren des Schwammspinners (z. B. *Calosoma sycophanta*, *Teneroides maroccanus* Reitter) wurden mit unterschiedlichen Erfolgen nach Nordamerika eingebürgert (Reardon, 1981).

Als erfolgreiches Beispiel für die biologische Kontrolle und Veränderung der Populationsdynamik des Schwammspinners ist an dieser Stelle die Einführung des

spezifischen Pilzes *Entomophaga maimaiga* (Entomophthorales) aus Japan zu nennen. Sporen des Pilzes wurden zum ersten Mal 1910 in der Region um Boston ausgebracht. Die erste Epizootie durch den Pilz in Nordamerika wurde beim Schwammspinner 1989 beobachtet. Um die Population zu regulieren, sind allerdings ideale Wetterbedingungen für die Entwicklung des Pilzes notwendig (Wegensteiner, 2003; Weseloh, 2003; Hajek, 1999).

Das *L. dispar* Kernpolyedervirus wird in Amerika und Europa im Rahmen einer biologischen Schädlingsbekämpfung seit mehr als 20 Jahren ausgebracht (Gypcheck) und z. B. in den USA, Russland und Moldawien produziert. Es konnte in vielen Fällen ein Ausbrechen einer Epizootie und ein Rückgang der Eigelegedichte beim Schwammspinner beobachtet werden, allerdings tritt die Wirkung des Präparats verzögert ein (Hajek, 1999; Langenbruch, 1993). Im Optimalfall muss das Virus bereits in der Progradationsphase ausgebracht werden (Bogenschütz und Schröter, 1993). Auch Präparate, die *Bacillus thuringiensis kurstaki* enthalten, sind bereits zur Bekämpfung des Schwammspinners am Markt und bekämpfen diesen sehr effektiv (Langenbruch, 1993).

Was ihre Biologie betrifft, sind Mikrosporidien für den Einsatz im Inokulationsverfahren im Rahmen einer biologischen Schädlingskontrolle prädestiniert: Viele Mikrosporidien sind wirtsspezifisch, die Übertragung findet meist peroral statt, oft auch transovariell. Dank der Verbreitung durch umweltresistente Sporen und vertikale Übertragung können sie unter Umständen die Diapause ihrer Wirte so überdauern (Linde, 1993; Goertz und Hoch, 2008b). Es gibt bereits Ansätze zur Verwendung verschiedener spezifischer Mikrosporidien im Rahmen der biologischen Schädlingsbekämpfung (Lee et al., 2008; Schwerdtfeger, 1970). In Lepidopteren werden sie oft als wichtige biologische Mortalitätsfaktoren gesehen, z. B. in Massenvermehrungen von *Tortrix* sp. in Deutschland, dramatische und sichtbare Epizootien werden allerdings meist nicht beobachtet (Maddox et al., 1998; Linde, 1993). Manche Autoren sehen Mikrosporidien in einer signifikanten Rolle in der Populationsdynamik von *L. dispar*; aus Russland gibt es zum Beispiel Beobachtungen, dass verschiedene Mikrosporidien wichtige Mortalitätsfaktoren in Schwammspinnermassenvermehrungen gewesen sind (1976-1977) (McManus und Solter, 2003; Linde, 1993).

Bis jetzt wurde kein natürliches Mikrosporidienvorkommen in amerikanischen Schwammspinnerpopulationen nachgewiesen. Um die Wahrscheinlichkeit des Einbrechens einer Massenvermehrung von *L. dispar* in den USA zu erhöhen, wäre der Einsatz eines virulenten Mikrosporidiums im Rahmen der biologischen Schädlingsbekämpfung denkbar

(McManus und Solter, 2003).

#### **1.4. Mikrosporidien**

Mikrosporidien sind eukaryotische, pathogene Einzeller und können eine Vielzahl von eukaryotischen Wirten befallen. Bislang sind 150 Gattungen beschrieben, die mehr als 1200 Spezies umfassen. Obwohl Mikrosporidien in vielen Lebewesen vorkommen können, sind sie bei Arthropoden und Fischen am häufigsten anzutreffen (Franzen, 2008; Lee et al., 2008; Keeling und Fast, 2002; Maddox et al., 1998). In Fischen sind Mikrosporidien ernstzunehmende Pathogene; *Loma salmone* löst zum Beispiel die Salmonidenkrankheit MSGD (Microsporidial Gill Disease) in Zuchtlachsen aus (Williams, 2009). In Honigbienen konnte eine Verbindung zwischen *Nosema ceranae* und dem Colony Collapse Disorder (CCD) der Honigbiene hergestellt werden, welches in den letzten Jahren weltweit zu beträchtlichen Völkerverlusten geführt hat (Williams, 2009; Chen et al., 2008; Martín-Hernandez et al., 2007). Das erste beschriebene Mikrosporidium war *Nosema bombycis*, der Erreger der Pébrine-Krankheit (Pfefferkrankheit) der Seidenraupe, 1857 durch Karl Wilhelm von Nägeli beschrieben (Keeling und Fast, 2002; Nägeli, 1857). Mitte des 18. Jahrhunderts führte diese Krankheit zu schlimmen Ausfällen in der Seidenproduktion (Corradi und Keeling, 2009). Nägeli beschrieb *Nosema bombycis* als hefeähnlichen Pilz und ordnete diesen den Schizomyceten zu (Corradi und Keeling, 2009; Nägeli, 1857).

Mikrosporidien sind obligate intrazelluläre Pathogene (Corradi und Keeling, 2009; Lee et al., 2008; Burri et al., 2006; Maddox et al., 1998). Sie sind hoch reduziert, es fehlen ihnen typische eukaryotische Zellbestandteile, wie z. B. ein Golgi-Apparat, Peroxisomen und Mitochondrien zur Energiegewinnung (Corradi und Keeling, 2009; Burri et al., 2006; McManus und Solter, 2003; Williams et al., 2002). Daraus folgt, dass sie als Energiequelle einen Wirt benötigen, dessen ATP sie aufnehmen (Williams, 2009). Es konnte beobachtet werden, dass sie sich in der Wirtszelle gerne in der Umgebung von Mitochondrien aufhalten, wodurch ihnen die ATP-Aufnahme erleichtert wird (Williams, 2009). Neuere Untersuchungen, die Mikrosporidien als Verwandte der Pilze ansehen, weisen darauf hin, dass Vorfahren der Mikrosporidien klassische Mitochondrien besessen haben (Corradi und Keeling, 2009). Es wurden kryptische, reduzierte Organellen (Mitosomen) in Mikrosporidien entdeckt, welche auch in verschiedenen amitochondrialen Protozoen gefunden werden können (z. B. *Entamoeba histolytica*). In Mikrosporidien sind diese Organellen hochreduziert, was ihre Größe und ihre biochemische Komplexität angeht. Die Funktion der Organellen ist

die Eisen-Schwefel-Anhäufung, während die Fähigkeit der ATP-Produktion im Laufe der Evolution verloren gegangen ist (Corradi und Keeling, 2009; Burri et al., 2006; Williams et al., 2002). Sie haben damit keine typische Funktion in der Aerobatmung, wie man sie von Mitochondrien kennt (Corradi und Keeling, 2009). Mitosomen haben kein Genom und sind auf den Import von Proteinen aus dem Nukleus angewiesen (Burri et al., 2006).

Evolutionsbiologen sehen Mikrosporidien aufgrund ihrer minimalen Genomgröße (2,3-23 Mb) als extrem reduzierte und von ihrem Wirt stark abhängige Eukaryoten an (Williams, 2009). Man nimmt an, dass der obligate, intrazelluläre Lebensstil wahrscheinlich zur Reduktion oder dem Verlust dieser Organellen geführt hat (Corradi und Keeling, 2009; Williams et al., 2002).

Lange Zeit wurden Mikrosporidien als Phylum Microsporidia (auch Phylum Microspora) den Protozoen zugeordnet. Das Fehlen von Mitochondrien ließ verschiedene Autoren darauf schließen, dass Mikrosporidien sehr alte, primitive Eukaryoten aus der Gruppe der Archaezoa seien (Review in Corradi und Keeling, 2009). Heute ist man der Ansicht, dass Mikrosporidien entweder eine Schwestergruppe der Pilze sind, oder eine frühe Linie innerhalb der Pilze repräsentieren. Genomanalysen am Tubulin unterstützen die Zuordnung zu den Pilzen am stärksten. Die genaue Beziehung zwischen den einzelnen Mikrosporidienarten ist noch nicht völlig geklärt (Corradi und Keeling, 2009; Franzen, 2008; Lee et al., 2008; Burri et al., 2006; Keeling und Slamovits, 2004; Undeen und Vander Meer, 1999).

Mikrosporidien sporen müssen typischerweise peroral aufgenommen werden und werden danach im Darm des Wirtstieres zur Keimung angeregt (Undeen und Vander Meer, 1999). Sie zeichnen sich durch eine einzigartige Form der Infektion aus, bei der eine Spore bei der Keimung ihr Polfilament ausschleudert und damit die Wirtszelle durchschlägt und infiziert (Franzen, 2008; Keeling und Fast, 2002; Maddox et al., 1998). Dabei wandert das Mikrosporidien-Sporoplasma durch das Polfilament in die Wirtszelle. Alle Mikrosporidien keimen in wässriger Umgebung (Undeen und Vander Meer, 1999). Aktiviert wird die Sporenkeimung durch eine Veränderung des pH-Werts und der Anionen/Kationen-Konzentration, die sich durch den Eintritt der Spore ins Verdauungssystem des Wirtes einstellt. Der osmotische Druck innerhalb der Spore erhöht sich durch den Abbau des Disaccharids Trehalose in ihren Monosaccharidbestandteil Glucose durch das Enzym Trehalase, was den Druck zum Ausschleudern des Polfilaments liefert (Corradi und Keeling,

2009; Williams, 2009; Undeen und Vander Meer, 1999). Trehalose nimmt in allen getesteten Mikrosporidienarten die Stelle als wichtigstes Speicherkohlenhydrat ein (Undeen und Vander Meer, 1999).

Aus Sicht der Parasitierung und der Evolutionsbiologie sind Mikrosporidien wichtige Modelle zum Verständnis der Pathogen-Wirts-Interaktion und der extremen Anpassung eines Pathogens an die intrazelluläre Umgebung im Wirt (Williams, 2009). *L. dispar* ist ein gutes Modell, um die Interaktionen zwischen Mikrosporidien und ihrem Wirt zu studieren, da das Insekt bereits umfangreich untersucht wurde und gut im Labor kultiviert werden kann (Hoch, 2008).

#### ***1.4.1. Vairimorpha disparis***

In der vorliegenden Arbeit wurde *Vairimorpha disparis*, ein wichtiges Pathogen von *L. dispar* (Vavra et al., 2006), untersucht. Insgesamt sind bisher fünf Arten aus drei verschiedenen Gattungen von Mikrosporidien (*Nosema*, *Endoreticulatus*, *Vairimorpha*) beschrieben, die in Schwammspinnerpopulationen vorkommen können:

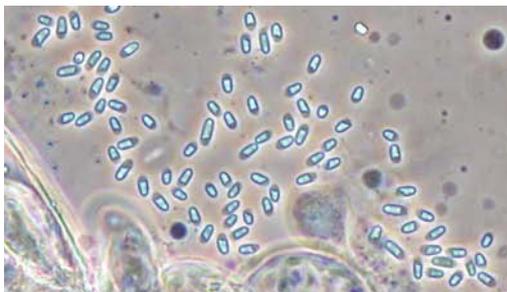
- *Endoreticulatus schubergi*
- *Nosema lymantriae*
- *Nosema serbica*
- *Nosema portugal*
- ***Vairimorpha disparis***

(Hoch, 2008; McManus und Solter, 2003)

Mikrosporidien aus der *Vairimorpha*-Gruppe werden im Vergleich zu ihren engen Verwandten aus der *Nosema*-Gruppe in verschiedenen Insektenwirten als sehr virulent angesehen (Goertz und Hoch, 2008a; Goertz und Hoch, 2008b; Maddox et al., 1998). Es gibt allerdings selten Berichte über dramatische Epizoen durch Mikrosporidien der *Vairimorpha*-Gruppe. Um ein Wirtstier erfolgreich zu infizieren, müssen nur wenige Sporen aufgenommen werden; infizierte Larven entwickeln sich nur selten vollständig in Adulte (Goertz und Hoch, 2008b; Maddox et al., 1998). Bei jungen Larven, die mit einer großen Sporenzahl infiziert worden sind, kann der Tod des Wirtes sehr schnell eintreten, da eine Darmschädigung unter Umständen zu einer Sepsis führt (Down et al., 2008). Im Larvenstadium führt eine Infektion mit *V. disparis* zum Absterben dieser, hauptsächlich geschieht die Transmission der Sporen über sich zersetzende, abgestorbene Kadaver der Wirtstiere (Goertz und Hoch, 2008a; Hoch

et al., 2002). Durch eine *V. disparis*-Infektion kann eine extreme Wachstumsreduktion ausgelöst werden, da hauptsächlich der Fettkörper befallen wird, der in den Larven für eine gesunde Entwicklung und einen stabilen Metabolismus von großer Bedeutung ist (Arrese und Soulages, 2010; Hoch und Schopf, 2001; Gilbert, 1976).

*V. disparis* weist 3 unterschiedliche Sporulationszyklen auf. Die Infektion beginnt im Mitteldarm mit dem primären Zyklus der Sporenbildung (Vavra et al, 2006; Hoch et al., 2002). Nach der Infektion im Mitteldarm werden zuerst zweikernige Primärsporen (Abbildung 3) gebildet, die die Infektion innerhalb des Wirtes verbreiten sollen, wodurch der Fettkörper befallen wird, der Hauptinfektionsort einer *Vairimorpha* sp.-Infektion (Vavra et al., 2006; McManus und Solter, 2003; Maddox et al., 1998). 3-5 Tage nach der Infektion können in infizierten Tieren bereits Meronten gefunden werden, Stadien des Wachstums und der Teilung (Hoch et al., 2002; Hoch, 2008).



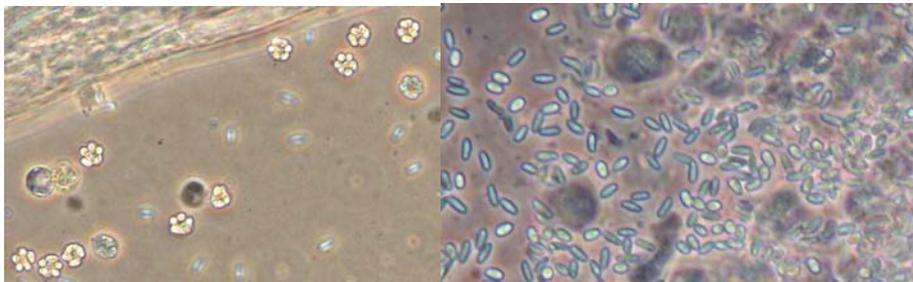
**Abbildung 3:** Primärsporen von *Vairimorpha disparis*

7 Tage nach der Infektion (in Folge als dpi - days post infection - bezeichnet) werden große Mengen zweikerniger Dauersporen im Fettkörper gebildet. Danach entstehen einkernige Dauersporen in Achtergruppen in sporophoren Vesikeln, sogenannten Oktosporen (Abbildung 4). Der Fettkörper wird mit Sporen ausgefüllt und auch die Gonaden können befallen werden (Hoch, 2008; Vavra et al., 2006). Ein infizierter Fettkörper erscheint makroskopisch weiß und geschwollen; im lichtmikroskopischen Präparat finden sich überall zweikernige Dauersporen und Oktosporen (Vavra et al., 2006).

Der Fettkörper nimmt im Metabolismus von Insekten eine bedeutende Rolle ein (Arrese und Soulages, 2010). Es handelt sich hierbei um ein dynamisches, multifunktionelles Gewebe bzw. Organ, welches sich durch den gesamten Insektenkörper zieht. Sein Hauptbestandteil sind Lipide, 90 % dieser gespeicherten Lipide sind Triglyceride. In vielen Bereichen des Metabolismus ist der Fettkörper von Bedeutung: So findet zum Beispiel der Fettsäure- und Kohlenhydrat-Stoffwechsel in ihm statt. Weiters ist der Fettkörper der Ort der

Proteinsynthese und wichtig für den Aminosäurestoffwechsel. Viele dieser Funktionen werden hormonell gesteuert, womit der Fettkörper zum Zielort verschiedener Insektenhormone wird (Arrese und Soulages, 2010). Eine Infektion mit *V. disparis* verursacht eine deutliche Reduktion der Speicherkohlenhydrat-Gehalte (Glykogen) in den Geweben, sowie der Fettsäure- und der Trehalose-Gehalte in der Hämolymphe. Die geringeren Fettsäuregehalte in der Hämolymphe der Schwammspinner stammen wahrscheinlich von einer reduzierten Fettsäuresynthese des Wirtstieres durch Beeinträchtigung des Fettkörpers (Hoch et al., 2002). Weiters kann eine *V. disparis*-Infektion eine Reduktion der Fettreserven des Wirtes, gemeinsam mit einer verstärkten Oxidation von Fettsäuren, zur Folge haben. Die dadurch produzierte Energie kann *V. disparis* als ATP aufnehmen (Hoch et al., 2002).

Der Fettkörper ist der Hauptsyntheseort für Trehalose, dem wichtigsten Blutzucker der Insekten, der zugleich das am häufigsten vorkommende Kohlenhydrat in Mikrosporidiensporen ist. Trehalose wird bei der Sporenreifung akkumuliert und spielt eine wichtige Rolle bei der Keimung von Mikrosporidiensporen. Möglicherweise nehmen Mikrosporidien Trehalose oder deren Vorstufen direkt von ihrem Wirt auf (Hoch et al., 2002).



**Abbildung 4 a + b:** Oktosporen und sporophore Vesikel (links) und zweikernige Dauersporen (rechts) können ca. 1 Woche nach der Infektion im Fettkörper der Raupen gefunden werden.

### 1.5. Juvenilhormone

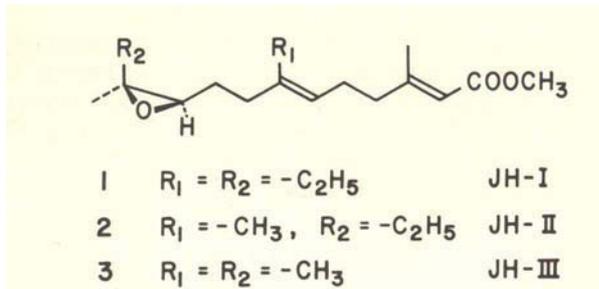
Wachstum und Entwicklung werden bei Insekten von einigen Hormonen, die in der Hämolymphe transportiert werden, reguliert. Die wichtigsten sind Juvenilhormon (Erhaltung des Larvalzustandes, Kontrolle der Häutungen) und Ecdyson (Einleiten einer Häutung) (Nation, 2008; Edwards et al., 2001; Edwards et al., 1995; Gupta, 1990; deKort und Granger, 1981; Williams, 1976). Juvenilhormone (JH) auch Neotenine genannt, sind sesquiterpenoide Verbindungen, die in Insekten verschiedene wichtige physiologische Prozesse einschließlich Metamorphose, Reproduktion, Diapause, Polymorphismus und Pheromonproduktion steuern. Sie sind Homologe und/oder Isomere des 10,11 Epoxids von Methylfarnesoat

(Minakuchi und Riddiford, 2006; Hammock und Sparks, 1977; Baker, 1990; Dahm et al., 1976; Hammock und Roe, 1985; deKort und Granger, 1981; Abbildung 5).

Die JH-Biosynthese findet ausschließlich in den Corpora allata statt (Nation, 2008, Kristensen, 2003; Minakuchi und Riddiford, 2006; Edwards et al., 1995; Baker, 1990; deKort und Granger, 1981; Dahm et al., 1976, Abbildung 6). Die Corpora allata sind über Nerven mit den Corpora cardiaca und dem Gehirn sowie den neurosekretorischen Zellen des Gehirns verbunden (Nation, 2008; Spindler, 1999). Nach seiner Ausschüttung in die Hämolymphe bindet das JH ein spezifisches Protein, Juvenilhormon-Bindungsprotein (JHBP) genannt, dessen Funktion der Transport des JH in der Hämolymphe und der Schutz vor dem Abbau durch Hämolymphenzyme ist. Ohne diese Schutzfunktion des JHBP würde das JH in der Hämolymphe durch unspezifisch wirkende Hydrolasen und Esterasen abgebaut und damit biologisch inaktiviert werden (Minakuchi und Riddiford, 2006; Goodman, 1990; deKort und Granger, 1981; Nowock et al., 1976). Das JHBP kann in Hämolymphe, Fettkörper und dem Integument gefunden werden. Es konnte beobachtet werden, dass ein hoher JH-Titer stets mit einem niedrigen JHBP-Gehalt einhergeht (Goodman, 1990). Kommt das JH in den Fettkörper, wird es von diesem aufgenommen (Nowock et al, 1976). JH sind nur in Spuren im Tier vorhanden. In jedem Larvenstadium wird das JH kurz vor dem Höhepunkt der Ecdysteroid-Ausschüttung abgegeben.

Aus chemischer und physiologischer Sicht können sechs Homologe in Insekten unterschieden werden (JH 0, 4Me-JH1, JH I, JH II, JH III, Methylfarnesoat), davon kommen vier in *Lepidopteren* vor (JH 0, JH I, JH II, JH III) (Kristensen, 2003; Nation, 2008; Gupta, 1990; deKort und Granger, 1981). Die einzelnen Homologe unterscheiden sich anhand kleiner Änderungen in der Molekülstruktur voneinander (Nation, 2008; Minakuchi und Riddiford, 2006). Im Unterschied zu JH I findet sich bei JH III am C7 des Moleküls anstatt einer Ethylgruppe eine Methylgruppe. Im Unterschied zu JH I und JH II besteht die Hauptkette des Moleküls aus 12, anstatt aus 13 C-Atomen (Abbildung 5).

JH 0, JH I und JH II finden sich ausschließlich in *Lepidopteren* (Dahm et al., 1976), während JH III in den meisten Insektenordnungen (z. B. *Lepidopteren*, *Hymenopteren*, *Coleopteren*,...) vorkommt. Die Homologe JH I, JH II und JH III unterscheiden sich deutlich in ihrer biologischen Aktivität und können artspezifisch und stadienspezifisch in unterschiedlichen Mengen zu finden sein (Kristensen, 2003; Edwards et al., 2001; Henrick et al., 1976).



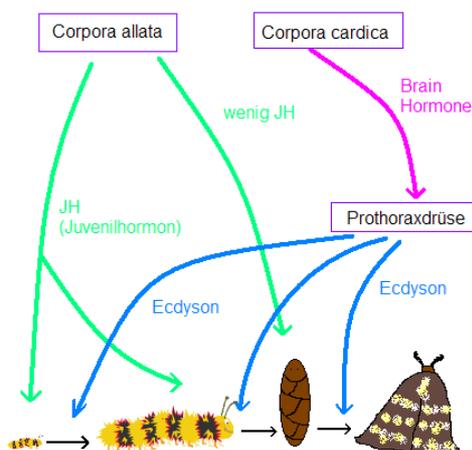
**Abbildung 5:** Chemische Struktur der drei Juvenilhormon-Homologen in Lepidopteren (aus Gilbert, 1976)

JH I: Methyl ( $\pm$ )- (2E, 6E, 10R\*, 11S\*)-10,11-Epoxy-3,7,11-trimethyl-2,6-tridecadi-enoat

JH II: Methyl ( $\pm$ )-2E, 6E, 10R\*, 11S\*)-10,11-Epoxy-7-ethyl-3,11-dimethyl-2,6-tri-decadienoat

JH III: Methyl ( $\pm$ )-(2E,6E,10R\*)-10,11-Epoxy-3,7,11-trimethyl-2,6-dodecadienoat

Im Tabakswärmer, *Manduca sexta*, kommen z. B. alle 3 Juvenilhormonhomologe vor, in Embryonen dieser Tiere JH 0. JH I kommt z. B. im Riesenseidenspinner *Hyalophora cecropia* vor (Minakuchi und Riddiford, 2006). JH II ist neben Spuren von JH I das im 4. und 5. Larvenstadium vorherrschende Homolog in der Gemüseeule, *Lacanobia oleracea* (Edwards et al., 2001). In der Maiseule, *Sesamia nonagrioides*, ist JH II das vorherrschende JH-Homolog neben JH I und JH III (Eizaguirre et al. 2005). Bei *L. dispar* können JH II und JH III gefunden werden, wobei JH III in höheren Konzentrationen als JH II zu finden ist (Schafellner et al., 2004). In den meisten Insekten finden sich Spuren von JH III als dem einzig vorkommenden JH (Minakuchi und Riddiford, 2006), außerdem wird dem JH III die höchste Bedeutung in der Häutungskontrolle zugeschrieben (deKort und Granger, 1981; Dahm et al., 1976). GC-MS-Analysen bei Lepidopteren (z. B. an *Diatraea grandiosella*) ergaben, dass mehrere Homologe gleichzeitig in unterschiedlichen Konzentrationen vorkommen können. Es ist allerdings noch nicht ausreichend untersucht, ob die unterschiedlichen JH-Homologe auch unterschiedliche Rollen in der Entwicklung des Tieres übernehmen können (Nation, 2008).



**Abbildung 6:** Die Rolle von Juvenilhormonen in Insekten (nach Pearson, 2010)

JH sind Moleküle mit einer Struktur, die sich leicht imitieren lässt. Viele Substanzen und Extrakte aus Pflanzengewebe haben JH-Aktivität. Verbindungen mit JH-Aktivität nennt man Wachstumsregulatoren; sie können z. B. dazu verwendet werden, Schädlinge zu kontrollieren (Nation, 2008; Zurflueh, 1976). Eine Vielzahl von Studien hat ergeben, dass *alle* JH-Homologe eine *bestimmte* Aktivität in *allen* Insekten haben (Edwards et al., 2001). Juvenilhormonanaloga werden schon seit ca. 40 Jahren synthetisiert und erfolgreich zur Schädlingsbekämpfung eingesetzt (Spindler, 1999).

Der JH-Titer in den Larvenstadien führt dazu, dass das Insekt im Larvenzustand verbleibt und die Metamorphose ins Puppenstadium und weiter ins adulte Stadium verhindert wird (Down et al., 2008; Edwards et al., 2001; Edwards et al., 1995; deKort und Granger, 1981; Williams, 1976). Im letzten Larvenstadium fällt der JH-Spiegel normalerweise ab und erlaubt so dem Insekt, sich ins Puppen- und danach ins adulte Stadium weiterzuentwickeln (Edwards et al., 2001). In adulten Tieren hat JH ganz unterschiedliche Funktionen und beeinflusst u. a. Reproduktion, Diapause und soziales Verhalten von Insekten (Minakuchi und Riddiford, 2006; Scott, 2006; Rembold, 1990).

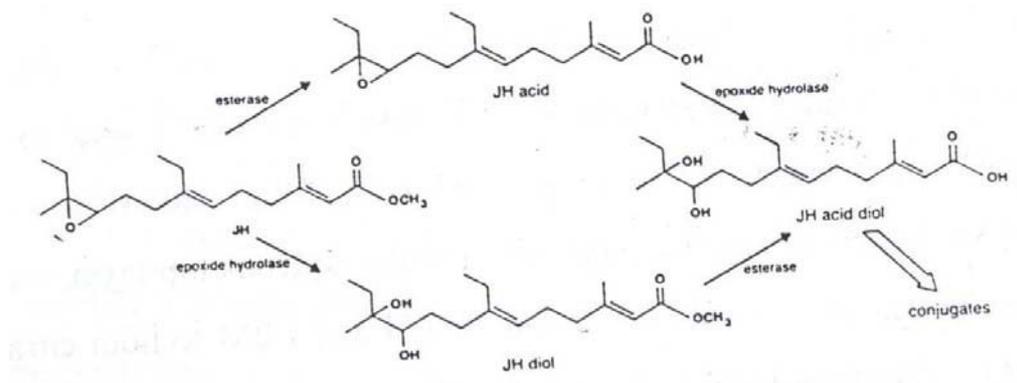
### ***Messung der JH-Proben mit dem GC-MS***

Frühe Methoden zur Messung der Juvenilhormone waren Bioassays, welche allerdings aufgrund der extrem geringen Mengen an JH in der Hämolymphe und dem Insektengewebe (Nanogramm-Bereich) relativ ungenau waren (Edwards et al., 1995; Schneiderman et al., 1960). Erst die Entwicklung moderner Messmethoden wie die Kopplung von GC oder HPLC mit Massenspektrometrie erlaubte die Quantifizierung der Juvenilhormone. Meist ist das Juvenilhormon unter GC-Bedingungen nicht stabil, was auf den reaktiven Oxiran-Ring im Molekül zurückzuführen ist. Daher ist es notwendig, das Molekül vor der Messung (wie oben beschrieben) zu derivatisieren, um es besser detektierbar zu machen und eine höhere Selektivität zu erreichen (Edwards et al., 2001; Gupta, 1990; Rembold und Lackner, 1984).

### **1.6. Juvenilhormon-Esterasen**

In Insekten sorgen u. a. zwei Enzyme für den Abbau des JH: die JH-Esterase und die Epoxid-Hydrolase (Abbildung 7; deKort und Granger, 1981). Für den Abbau des JH ist in der Hämolymphe von *L. dispar* nur die JH-Esterase von Bedeutung (Nussbaumer, 1998). Das Enzym kann den JH-Titer abbauen und damit z. B. im letzten Larvenstadium die Metamorphose zum adulten Tier ermöglichen; Aktivitätspeaks treten typischerweise vor der

Wanderung und Verpuppung von Insekten auf (Gupta, 1990). Der Fettkörper gilt als die Hauptquelle für Hämolymphe-JH-Esterasen (Wroblewski et al., 1990; deKort und Granger, 1981).



**Abbildung 7:** Möglichkeiten einer Juvenilhormon-Inaktivierung (aus Nussbaumer, 1998)

JH-Esterasen sind Enzyme, die im JH-Molekül in Lepidopteren, Coleopteren und Dipteren die Esterbindung spalten und JH-Säuren erzeugen (Abbildung 7) (Nation, 2008; Minakuchi und Riddiford, 2006; Roe und Venkatesh, 1990; deKort und Granger, 1981). Das Enzym hat ein hydrophobes Bindungsende, gekoppelt an drei essentielle Aminosäuren, die für seine Aktivität notwendig sind. Dadurch bindet es an das lipophile JH-Molekül (Minakuchi und Riddiford, 2006). Im Gegensatz zu unspezifischen JH-Esterasen können die spezifischen JH-Esterasen auch JH spalten, wenn es an das JHBP gebunden ist (Roe und Venkatesh, 1990; deKort und Granger, 1981).

Die Aktivität der JH-Esterasen unterliegt einer regulatorischen Kontrolle durch Translation und Transkription. Die Basis der JH-Esterase-Expression oder die Induktion ihrer Aktivität ist nicht bekannt. Bald nach seiner Translation wird das Enzym wieder abgebaut. Das ermöglicht eine flexible und schnelle Regulationsmethode des JH-Titers in der Larvalentwicklung (Nussbaumer, 1998). Studien haben gezeigt, dass die Aktivität der JH-Esterase in den früheren Larvenstadien sehr gering ist, in den späteren Stadien allerdings sehr deutlich ansteigt. Diese Aktivitätspeaks unterscheiden sich von Insekt zu Insekt (Nussbaumer, 1998; Roe und Venkatesh, 1990; Jones et al., 1982). Das Enzym wird hauptsächlich in der Hämolymphe und dem Fettkörper, in dem es gebildet wird, gefunden (deKort und Granger, 1981).

Normalerweise wird der JH-Titer verändert, indem die Aktivität der JH-Esterase reduziert oder blockiert wird, was dazu führt, dass sich JH in der Hämolymphe anreichern kann, da es nicht abgebaut, jedoch weiterhin synthetisiert wird. Aber auch die Synthese des JH in den CA

kann reguliert werden (Schafellner et al., 2007; Edwards et al., 1995). Da die Schwankungen der Aktivität der JH-Esterase mit Veränderungen im JH-Titer korrelieren, geht man davon aus, dass dieses Enzym die Hauptrolle in der Regulation des JH-Titers spielt (deKort und Granger, 1981). Eine Reduktion der JH-Esterase-Aktivität könnte zu einem erhöhten JH-Titer führen, der das Larvenstadium des Wirtstieres verlängert, was auch für parasitische Organismen nützlich sein könnte. Im Falle von Endoparasitoiden kann dies die Verpuppung der Wirtsraupe verhindern; im Falle von Mikrosporidien ermöglicht eine längere Entwicklung die Produktion einer größeren Sporenanzahl für die Weiterverbreitung. Schon 1962 wurde vermutet, dass Mikrosporidien Einfluss auf den JH-Titer ihrer Wirte haben könnten, allerdings wurde kein quantitativer Nachweis erbracht (Fisher und Sanborn, 1962). Der erste Nachweis eines erhöhten JH-Titers in von Mikrosporidien infizierten Wirten wurde erst vor Kurzem in *Lacanobia oleracea* (Gemüseeeule), infiziert mit *Vairimorpha necatrix*, erbracht (Down et al., 2008). Es wäre also durchaus denkbar, dass eine Mikrosporidieninfektion durch *V. disparis* mit Hilfe der JH-Esterasen den JH-Titer ihres Wirtes *L. dispar* manipuliert. Dies soll in der vorliegenden Arbeit durch Messungen des JH-Titers und Messungen der JH-Esterase-Aktivität in der Hämolymphe von Schwammspinnerrauen, infiziert mit *V. disparis*, untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### ***2.1. Insekten und Pathogene***

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Schwammspinnerraupen stammen aus Eigelegen des New Jersey Standard Strain, die vom USDA/APHIS Otis Method Development Center aus CapeCod, MA, USA zur Verfügung gestellt wurden.

Die Sporen von *V. disparis* wurden vom Illinois Natural History Survey, Urbana-Champaign, IL, USA, dem Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz zur Verfügung gestellt (Isolat-Nummer 1995-C; das Isolat stammt aus Fettkörpern infizierter *L. disparis*-Larven, die 1995 bei Rupite, Bulgarien, gesammelt wurden). Die für die Versuche verwendeten Mikrosporidien wurden am Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz weitervermehrt und gelagert.

### ***2.2. Versuchsaufbau***

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden in mehreren Ansätzen Schwammspinnerraupen gezüchtet und in eine Kontrollgruppe und eine Gruppe zur Infektion eingeteilt. Diese Tiere wurden nach ihrer Häutung ins L4 mit *V. disparis* infiziert, danach wurden an unterschiedlichen Probennahmetagen sowohl bei infizierten als auch bei unbehandelten Tieren (Kontrollen) Hämolympfproben gezogen. Bei diesen wurden anschließend der JH-Titer mittels GC-MS nach Rembold und Lackner (1984) und die JH-Esterase-Aktivität mittels Partition Assay nach Hammock und Sparks (1977) gemessen.

#### ***2.2.1. Sporengewinnung für Infektionen***

Mehrere mit *V. disparis* infizierte Raupen im L5 wurden seziiert. Der Darm der Raupen wurde entfernt, der Fettkörper herausgelöst und in einen Homogenisator gefüllt. Das Gewebe wurde in Wasser sorgfältig homogenisiert und durch Zellstoff filtriert. Die trübweiße Fettkörper-Sporen-Suspension wurde bei 3500 Umdrehungen/min 15 min lang zentrifugiert. Am Grund des Zentrifugenröhrchens bildete sich ein Pellet, das die Sporen enthielt. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in einigen Tropfen Wasser suspendiert. Die Suspension wurde gut geschüttelt. Danach wurden 0,5 ml der Sporenlösung in Gefrier-Vials gefüllt und mit 0,5 ml Glycerol als Gefrierschutz überschichtet. Die Vials wurden verschlossen, gut gemischt und in Flüssigstickstoff gelagert, in dem die Sporen über mehrere Jahre lebensfähig bleiben können (Maddox et al, 1998).

### ***2.2.2. Zucht der Schwammspinnerraupe***

*L. dispar*-Eigelege wurden im Klimaschrank bei einer Photoperiode von 16L:8D bei  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  und ca. 65 % relativer Luftfeuchte zum Schlüpfen gebracht. Sobald die Mehrzahl der Raupen geschlüpft war, wurden diese in Kunststoffbechern (10 x 7 cm) mit Weizenkeimdiät (nach Bell et al., 1981) zu ca. 200 Stück pro Gefäß gehalten. Nach einigen Tagen wurden die Tiere auf jeweils 100 Raupen pro Futtergefäß aufgeteilt. Nachdem die Raupen das L3 erreicht hatten, wurden sie in Sippen zu 10 Tieren in Glaspetrischalen gehalten. Alle zwei Tage wurde das Futter erneuert, der Kot entfernt und die Entwicklung der Tiere dokumentiert. Typischerweise entwickeln sich Männchen und Weibchen unter diesen Bedingungen durch 5 Larvenstadien (Schafellner et al., 2004).

### ***2.2.3. Infektion von L. disparis***

Die tiefgefrorene *V. disparis* Sporensuspension wurde aufgetaut und geschüttelt. Es wurde ein Tropfen der Suspension in eine Glaseprouvette überführt und destilliertes Wasser hinzugegeben. Mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Abbildung 8) wurde die Sporenkonzentration in der Suspension bestimmt.



**Abbildung 8:** Zählkammer nach Neubauer

Der Mittelwert aus 6 unabhängig ausgezählten Kammern diente der Ermittlung der Sporenanzahl /  $\mu\text{l}$ . Die Konzentration der Suspension wurde mit destilliertem Wasser auf 3000 Sporen /  $\mu\text{l}$  eingestellt. Alle Infektionen in dieser Arbeit wurden mit einer Dosis von 3000 Sporen / Raupe (1  $\mu\text{l}$  Sporensuspension mit 3000 Sporen) durchgeführt.

Zur Infektion wurden Raupen im ersten Tag des vierten Larvenstadiums verwendet. In Zellkulturplatten (Corning, 24 well plates) wurde mit einer Pinzette in jedes Well ein ca. 2  $\text{mm}^3$  großes Stück Weizenkeimdiät platziert (Abbildung 9). Für die Infektion wurde auf jedes Futterstück 1  $\mu\text{l}$  Sporenlösung aufgetragen, bei der Kontrollgruppe 1  $\mu\text{l}$  Wasser. Anschließend wurde in jedes Well eine L4-Raupe gesetzt.

Nur jene Larven, die den Weizenkeimdiätblock innerhalb von 24 h vollständig aufgefressen hatten und keine Entwicklungsschwierigkeiten aufwiesen, wurden für den Versuch

verwendet. Bei den Versuchen war bei einer Inokulation mit 3000 Sporen /  $\mu\text{l}$  eine sehr hohe Infektionseffizienz (>99 %) zu beobachten.



**Abbildung 9:** Infektion der Schwammspinner am ersten Tag des L4 in Zellkulturplatten.

#### ***2.2.4. Hämolymp-Probengewinnung***

Zur Gewinnung von Hämolympproben wurde den Raupen mit einer Mikroschere ein Bauchbein abgeschnitten und die austretende Hämolymphe mit einer Mikrokapillare aufgefangen. Wenn möglich wurden ungefähr gleich entwickelte Raupen für die Probennahmen verwendet. Die Probennahmetage wurden so gewählt, dass der Infektionsfortschritt der Mikrosporidien möglichst lückenlos dokumentiert werden konnte.

Folgende Probennahmen wurden durchgeführt:

JH-Esterase-Messungen      Ansatz I: 3, 5, 8, 10, 12 days post infection (dpi) (n=4-8)

   Ansatz II: 8, 10, 12, 14 dpi (n=10)

JH-Messungen                Ansatz I + II: 5, 8, 10, 12 dpi (gepoolte Proben á 10 Raupen, n=5-6)

   Ansatz III: 5, 8, 10, 12 dpi (Einzelraupen, n=5-6)

#### ***Hämolympgewinnung für die JH-Esterase-Aktivitätsbestimmung***

Pro Probennahmetermin für die JH-Esterase-Aktivitätsbestimmungen wurden von 8-10 Raupen aus der Kontrollraupen- und von 8-10 Raupen aus der infizierten Gruppe Hämolympproben genommen. Dafür wurden Eppendorf-Reaktionsgefäße mit 100  $\mu\text{l}$  50 mM Natrium-Phosphatpuffer (5 % Saccharose, 0,02 %, Natriumazid als Konservierungsmittel, 0,01 % Phenylthioharnstoff als Phenoloxidaseinhibitor, pH 7,4) befüllt. Jede beprobte Raupe wurde vor der Hämolymp-Gewinnung gewogen und das Gewicht notiert. Bei der Probennahme wurde von den infizierten Raupen ein Quetschpräparat des Fettkörpers angefertigt und der Infektionsstatus der Raupen anhand des lichtmikroskopischen Befundes (Phasenkontrast, 400 x Vergrößerung) dokumentiert. Zur Probennahme wurde ein Bauchbein der Raupe abgeschnitten und mit Hilfe einer Mikrokapillarpipette wurden 10  $\mu\text{l}$  Hämolymphe entnommen. Jede Probe wurde in ein Reaktionsgefäß mit Puffer überführt,

geschüttelt und sofort auf Eis gestellt. Die Proben wurden bis zur Messung der JH-Esterase-Aktivität bei -20°C gelagert.

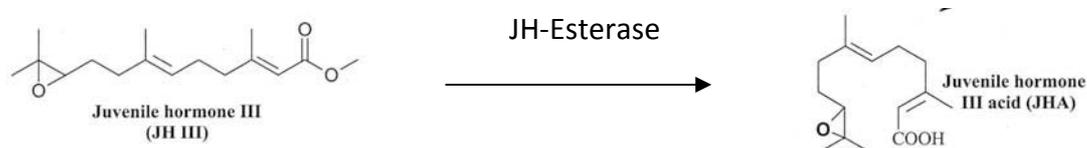
### ***Probennahme für die JH-Bestimmung***

Der JH-Gehalt wurde in Hämolympfproben bestimmt. In Ansatz I & II wurde die Hämolymphe von 10 Raupen zu einer Probe gepoolt. Pro Raupe wurden 20 µl Hämolymphe gewonnen. Insgesamt wurden je Probennahmetermin 6 Proben aus der infizierten Gruppe und 6 Proben aus der Kontrollgruppe genommen.

Glasvials wurden mit 1 ml Methanol befüllt und auf Eis gestellt. Die Raupen wurden gewogen. Bei der infizierten Gruppe wurde bei Ansatz I und II von 2 Raupen je Probe bei der Probennahme ein Quetschpräparat des Fettkörpers angefertigt und der Infektionsstatus der Raupen unter dem Phasenkontrastmikroskop dokumentiert. Zur Entnahme der Hämolymphe wurde jeder Raupe ein Bauchbein abgeschnitten und 20 µl der austretenden Hämolymphe mit einer Mikrokapillarpipette aufgenommen und in das eisgekühlte Methanol transferiert (Summe: 200 µl Hämolymphe in 1 ml Methanol). Zur Ausfällung des Proteins wurden die Glasvials anschließend geschüttelt und die Proben bis zur JH-Messung bei -20°C aufbewahrt. Bei Ansatz III wurden Einzelraupen verwendet, um weniger durch Begleitstoffe verunreinigte Proben zu erhalten (Summe: 20 µl Hämolymphe in 1 ml Methanol).

### ***2.2.5. Messung der JH-Esterase-Aktivität mittels Partition Assay***

**Prinzip JH-Esterase-Aktivitätsmessung nach Hammock und Sparks (1977):** Das wasserunlösliche, biologisch aktive JH wird durch das Enzym JH-Esterase in die wasserlösliche, nicht biologisch aktive JH-Säure gespalten (Abbildung 10). Als Substrat für das Enzym wird <sup>3</sup>H-markiertes JH III zugegeben. Je nach Aktivität des Enzyms findet sich ein Teil der radioaktiven Markierung in der JH-Säure wieder; dieser kann danach im Scintillationszähler gemessen werden. Die Radioaktivität der Proben ist umso höher, je mehr Substrat (<sup>3</sup>H-JH III) das Enzym in <sup>3</sup>H-JH-Säure umgesetzt hat. Das Assay nach Hammock und Spark ist anwendbar, da die JH-Esterase das einzige vorkommende JH-abbauende Enzym in der Hämolymphe von *L. dispar* Raupen ist (Schafellner et al. 2007).



**Abbildung 10:** Umsatz von JH III durch die JH-Esterase zu JH-Säure

Die Proben wurden aufgetaut und anschließend verdünnt. Als erste Messung wurde eine Verdünnung aus 20 µl Probe und 400 µl Phosphatpuffer gewählt (d. h. 21-fach).

Die folgenden Schritte wurden, falls nicht anders erwähnt, auf Eis durchgeführt (Abbildung 11). In Reaktionsgefäßen wurden 100 µl Puffer aliquotiert. Es wurden pro Probe 2 Reaktionsgefäße mit jeweils 100 µl verdünnter Hämolympheprobe befüllt. In alle Proben wurde mit einer Hamilton-Pipette 1 µl <sup>3</sup>H-markiertes Juvenilhormon JH III als Substrat für die Enzymreaktion (Konzentration  $5 \times 10^{-6}$  M in Isooktan, New England Nuclear, Perkin Elmer, Boston, MA) hinzugefügt.



**Abbildung 11:** Die Proben wurden aliquotiert und mit JH III als Substrat für die Enzymreaktion versetzt.

Die Proben wurden geschüttelt und für 15 min in einem auf 30°C temperierten Wasserbad inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde mit einer Methanol: Wasser: Ammoniumhydroxid-Lösung (Verhältnis 10:9:1; v:v:v) die Enzymreaktion gestoppt.

In alle Proben kamen 100 µl Trichlorethylen, um die Phasen in eine organische (unten) und eine wässrige Phase (oben, darin befindet sich die JH-Säure) zu trennen. Es wurde eine Minimumprobe (keine Hämolymphe enthalten) und eine Maximumprobe (keine Phasentrennung) mitgeführt. Die umgesetzte JH-Säure befand sich bei den Proben nun in wässriger Lösung, während das nicht umgesetzte JH in der organischen Phase verblieb. Alle Proben wurden 30 sec lang geschüttelt und anschließend 5 min bei 12000 U/min zentrifugiert.

Scintillationsfläschchen wurden mit 2 ml Scintillationsflüssigkeit (Ultima Gold high flash point LSC Cocktail for aqueous and nonaqueous samples) befüllt, welche die Strahlung bremst. Zur Detektion möglicher Verunreinigungen durch die Probenaufbereitung für die Messung wurde ein Blindwert (nur Scintillationsflüssigkeit) mitgeführt.

50 µl der wässrigen Phase, welche die Juvenilhormon-Säure enthält, wurden in die Scintillationsgefäße überführt. Die Fläschchen wurden 30 sec lang geschüttelt und vor der Messung mindestens 2 Stunden zur Reduktion der Chemolumineszenz gekühlt. Die β-Strahlung der Proben wurde für 3 x 2 min in Duplikaten im Scintillationszähler (Abbildung 12) registriert.



**Abbildung 12:** Scintillationszähler Tri-Carb 2500 TR zur Messung der Enzymaktivität

Aus 2 Doppelmessungen wurde jeweils ein Mittelwert gebildet.

Folgende Gleichung wurde verwendet, um die JH-Esterase-Aktivität zu berechnen:

**Formel 1:** Formel zur Berechnung der JH-Esterase-Aktivität;

**JH III:** Konzentration von JH III, hier  $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ;

**D:** Verdünnungsfaktor der Hämolymphe;

**t:** Inkubationszeit in min;

**0,333:** 5 (Konzentration des JH III in ml)/ 15 (min);

**cpm:** average counts per minute;

**cpm<sub>max</sub>:** Maximummessung (keine Phasentrennung);

**cpm<sub>min</sub>:** Minimummessung (keine Probe enthalten).

$$nM \text{ _JH _metabolisiert / min/ ml} = (\% \text{ _Metabolisiert} / 100) * JH \text{ _III} * D * 0,333$$

$$\% \text{ _Metabolisiert} = \left( \frac{(cpm_{sample} - cpm_{min}) * 2}{(cpm_{max} - cpm_{min})} \right) * 100$$

Die Proben wurden soweit verdünnt, bis 10-40% des JH III in der Reaktionszeit (15 min) zu JH-Säure umgesetzt waren. Diese Umsatzrate umfasst den linearen Bereich der Reaktion, der zur Quantifizierung der Aktivität benötigt wird. Im Fall, dass die Umsatzrate nicht im gewünschten linearen Reaktionsbereich (10-40% von  $5 * 10^{-6} \text{ M}$  JH III) lag, wurden die Proben neu verdünnt und nochmals gemessen. Die Gesamtverdünnung lag zwischen dem 38,5- und 1155-fachen. Die Umsatzrate der JH-Esterase wurde in nM/ml Hämolymphe und min JH III angegeben.

### 2.2.6. JH-Extraktion und Derivatisierung

#### Prinzip Extraktion und Derivatisierung des JH nach Rembold und Lackner, 1984:

Das JH in Methanol wurde mit zwei internen Standards (JH I Ethyl, JH III Ethyl) versetzt und seine Ethylester mittels Isooktan extrahiert (Abbildung 13). Danach wurde das JH an  $\text{Al}_2\text{O}_3$  adsorbiert, über Waschschrte mit Lösungsmitteln und Gemischen von Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität (Tabelle 1) von lipophilen Begleitsubstanzen befreit und vom  $\text{Al}_2\text{O}_3$  desorbiert. Nach Derivatisierung mit DMNFHS (in Pyridin) wurde es wiederum auf  $\text{Al}_2\text{O}_3$  adsorbiert, über weitere Waschschrte gereinigt, desorbiert und danach mittels GC-MS bestimmt. Bei jeder Aufarbeitung von Hämolympfproben wurde separat eine Probe mitgeführt, die nur die beiden internen Standards JH I Ethyl und JH III Ethyl enthielt.

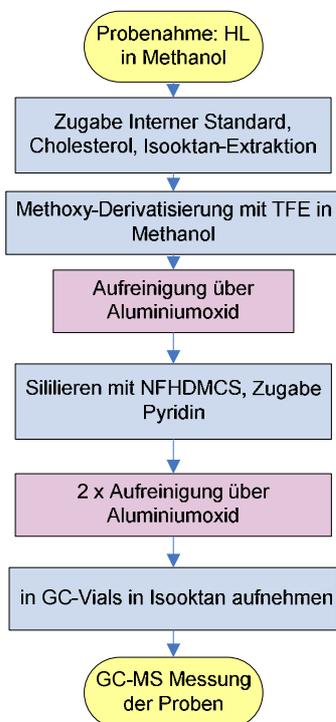


Abbildung 13: Überblick über die JH-Extraktion und Derivatisierung

Tabelle 1: Chemikalien für die JH-Extraktion und Derivatisierung

Name	Summenformel	Gehalt	Firma
Aluminiumoxid	$\text{Al}_2\text{O}_3$	Aktivitätsstufe III, 4,9 % $\text{H}_2\text{O}$ , VWR	Merck
1-Chlormethan	$\text{C}_4\text{H}_9\text{Cl}$	99,8 %, für Flüssigchromatographie	Merck
Dichlormethan	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	99,8 %	Merck
Ethylacetat	$\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$	99,5 %, reinst	Merck
Isooktan	$\text{C}_8\text{H}_{18}$	Für die Gaschromatographie	Merck
Methanol	$\text{CH}_4\text{O}$	99,5	Roth
Natriumchloridlösung	$\text{NaCl}$	2 %	-
Nona-fluoro-hexyl-dimethyl-chlorosilan	NFHDMCS		Fluka
Pentan	$\text{C}_5\text{H}_{12}$	99 %	Merck

Trifluoressigsäure TFA	$C_2HF_3O_2$	>98 %	Merck
Toluol	$C_7H_8$		Roth

Die verwendeten JH-Ethyl-Standards und das NFHDMCS wurden von Prof. Rembold (BRD) zur Verfügung gestellt.

Bei der Aufarbeitung ist zu beachten, dass die Probe nie mit Kunststoffoberflächen in Berührung kommt.

Die Hämolympheproben in MeOH wurden geschüttelt, mit einer Pasteurpipette in dickwandige Glaszentrifugenröhrchen überführt und das Probefläschchen 2x mit jeweils 0,5 ml Methanol nachgewaschen und mit der Hämolympheprobe vereinigt.

5  $\mu$ l Ethyl Standard (0,1 pmol/ $\mu$ l, JH IE + JH III E enthalten) wurden zugegeben und mit 100  $\mu$ l Cholesterin der interne Standard ins Glas gespült. Cholesterin verhindert, dass JH an der Glasoberfläche haften bleibt.

#### ***a. Isooktan-Extraktion***

Zu den methanolischen Hämolympheproben wurden jeweils 1 ml Isooktan und 2 ml Natriumchloridlösung (2 %) gegeben und die Röhrchen geschüttelt. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 0°C 4000 U/min zentrifugiert. Der Überstand (org. Phase) mit dem JH wurde mittels Pasteurpipette in Glas-Derivatisierungsröhrchen (DR) gefüllt. Der Waschschrift mit Isooktan und anschließender Zentrifugation zur Phasentrennung wurde ein zweites Mal wiederholt.

#### ***b. Aufreinigung über Aluminiumoxid-Röhrchen***

Pasteurpipetten wurden an der Verengungsstelle mit Glaswolle verstopft und anschließend mit  $Al_2O_3$  (4,9%  $H_2O$ , Aktivitätsstufe III) gefüllt, um sie zur Aufreinigung der Proben verwenden zu können. Die Glassäulchen wurden bei den einzelnen Waschsritten abwechselnd mit Lösungsmitteln verschiedener Polarität gespült:

Vor dem Füllen mit  $Al_2O_3$  wurden die leeren Säulchen mit Dichlormethan als Lösungsvermittler gespült, danach 5,2 cm hoch mit  $Al_2O_3$  befüllt und mit 1-Chlormethan equilibriert. Der Hämolymphe-JH-Extrakt in Isooktan wurde auf das Säulchen getropft und mit 3 x 1 ml 1-Chlorbutan gewaschen; der Flowthrough wurde verworfen. Im nächsten Schritt wurde das JH mit 2 x 1ml 10 % Ethylacetat / Dichlormethan von den Säulchen herunter gewaschen, in neuen DR aufgefangen und das Lösungsmittel unter Helium getrocknet. (ca. 10 min, Abbildung 14).

### *c. Methoxy-Derivatisierung*

Die trockenen Proben wurden mit 150 µl 5 % TFA in Methanol vermischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 2 x 1 ml Pentan hinzugefügt, geschüttelt und das Lösungsmittel unter Helium abgeblasen. Die trockene Probe wurde in 1 ml Isooktan gelöst.



**Abbildung 14:** Abblasen des Lösungsmittels im Heliumstrom.

### *d. Aufreinigung über Aluminiumoxid-Röhrchen*

Neue Säulchen wurden mit Dichlormethan gewaschen und mit  $\text{Al}_2\text{O}_3$  5,2 cm hoch befüllt. Die Säulchen wurden mit 1 ml Isooktan equilibriert, danach wurde die Probe aufgetragen. Das  $\text{Al}_2\text{O}_3$  mit dem JH wurde 1ml 1-Chlormethan und 1 ml Dichlormethan gewaschen und das JH anschließen mit 70% Ethylacetat / Pentan vom  $\text{Al}_2\text{O}_3$  desorbiert und in neuen DR aufgefangen.

### *e. Silylieren mit nona-fluoro-hexyl-dimethyl-chlorsilan*

Das Eluat aus Punkt d wurde mit 100 µl Pyridin und 25 µl NFHDMCS (nona-fluoro-hexyl-dimethyl-chlorsilan, Silylierungsmittel) vermischt und am Heizblock bei 60°C silyliert. Überschüssiges Silylierungsmittel wurde mit 1 ml Pentan und 25 µl getrocknetem Methanol entfernt. (Abbildung 14, nach Rembold et al., 1980). Ziel des Silylierens ist es, das JH-Molekül bei der Messung am GC ohne thermischen Zerfall in den Gaszustand überzuführen; OH-Gruppen aus dem Silylierungsreagenz NFHDMCS machen das Molekül volatiler.



**Abbildung 15:** Vermischen der Proben mit Pyridin und anschließende Filtration.

### ***f. Filtration über Aluminiumoxid-Röhrchen***

Frische Pasteurpipetten mit Glaswolle wurden **2 cm** hoch mit  $\text{Al}_2\text{O}_3$  befüllt und mit 1 ml Dichlormethan equilibriert. Danach wurden die Proben aus 5. aufgebracht und in frischen DR aufgefangen. Es ist wichtig, die Proben hier zu filtrieren, da das restliche Silylierungsmittel entfernt werden muss (Abbildung 15).

Die Proben wurden mit 1 ml 60% Dichlormethan / Pentan nachgewaschen, das Lösungsmittel anschließend im Heliumstrom abgeblasen. Die getrocknete Probe wurde so oft mit 1 ml Pentan gewaschen und das Lösungsmittel abgeblasen, bis kein Pyridingeruch mehr festzustellen war.

### ***g. Aufreinigung über Aluminiumoxid-Röhrchen***

Säulchen wurden mit 5,2 cm  $\text{Al}_2\text{O}_3$  befüllt, zweimal mit Dichlormethan und einmal mit 20 % Toluol / Isooktan equilibriert und danach die Proben auf die Säulen aufgebracht. Die DR wurden zweimal mit 20% Toluol / Isooktan nachgewaschen, um das JH möglichst quantitativ zu transferieren. Die Waschlösung wurde danach mittels Pasteurpipetten auf die Säulen aufgebracht. Weiters wurden die Säulen mit 1 ml Pentan gewaschen.

Um das JH vom  $\text{Al}_2\text{O}_3$  zu lösen, wurde 2 mal 1 ml 60% Dichlormethan/ Pentan verwendet und das Eluat unter Helium abgeblasen.

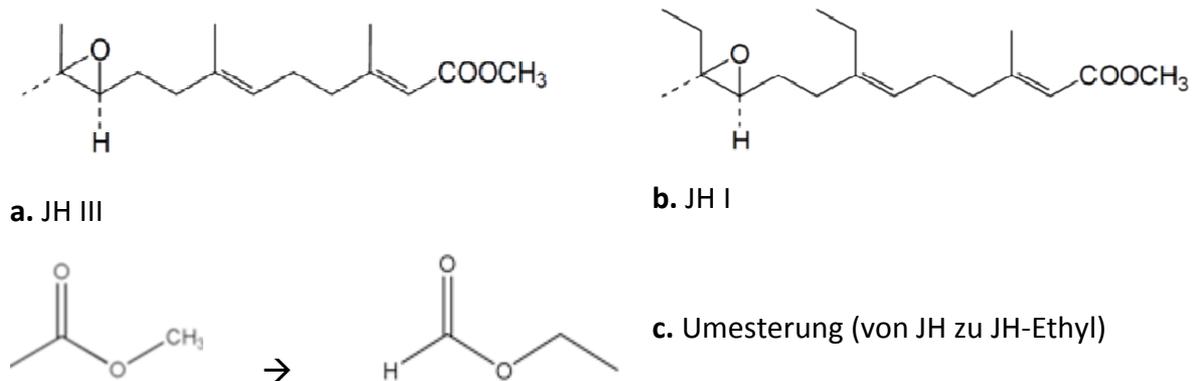
### ***h. Probenaufbewahrung für GC-MS***

Die getrocknete Probe wurde in 150  $\mu\text{l}$  Pentan gelöst, auf  $-20^\circ\text{C}$  gekühlt und danach vorsichtig mit einer Pasteurpipette in GC-Vials mit Glas-Mikroeingängen pipettiert. Das Lösungsmittel wurde im Abzug entfernt. Die getrocknete Probe wurde in 20  $\mu\text{l}$  Isooktan aufgenommen und die Vials mit Aluminiumkappen mit Tefloneinsatz dicht verschlossen.

Bis zur Messung am GC wurden die Proben bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.3. Messung am GC-MS

Die externen Standards enthielten JH I, JH II und JH III zur Sensitivitätseinstellung des GC-MS und zur Bestimmung der Retentionszeiten der JH. Als interne Standards waren JH I-Ethyl und JH III-Ethyl in den Proben vorhanden, die Umesterung von **Methyl**-10,11-epoxyfarnesoat (JH III) zu **Ethyl**-10,11-epoxyfarnesoat (JH III E) und analog von JH I zu JH I E folgt der Methode nach Mori et al., 1973 (Abbildung 16).



**Abbildung 16:** (a) JH III, (b) JH I, (c) Umesterung einer Methylestergruppe zu einer Ethylestergruppe. Aus dieser Umesterung resultieren die als interne Standards verwendeten Moleküle JH III-Ethyl und JH I-Ethyl.

Die Messung der JH-Moleküle erfolgte an einem GCD (Agilent, Hewlett Packard G 1800 C). Als Trennsäule wurde eine J&W Scientific 30 m x 0,250 mm DB1 MS-Säule verwendet. Die Laufzeit betrug 16 Minuten. Es wurde im Splitless-Modus gemessen; 5 µl der Probe wurden injiziert. Die Flussrate des Heliumstroms betrug 1 ml/min. Gemessen wurde bei einer Injektortemperatur von 300°C und einer Detektortemperatur von 330°C. Die Heizraten betragen 25°C/min von 150 auf 200°C, 1 min konstant und 15°C/min von 200 auf 340°C, 3 min konstant. Mithilfe eines Standardgemisches (JH I, JH II, JH III, JH I-Ethyl, JH III-Ethyl) wurden die Retentionszeiten der JH-Homologe sowie der internen Standards ermittelt. Es wurde im SIM (Single Ion Mode) gemessen, wobei charakteristische Molekülbruchstücke für die einzelnen JH-Homologe ausgewählt wurden. Dadurch lässt sich eine höhere Empfindlichkeit der Detektion erreichen.

**Tabelle 2:** Überblick über die Retentionszeiten der JH und der Standards (JH III-Ethyl, JH II-Ethyl, JH I-Ethyl)

Molekül		Ion (m/z)	Molekulargewicht FW	Retentionszeit Rt (min)
JH III		376	<b>266,4</b>	10,1
JH III E	Interner Standard	376	280,4	10,3
JH II		390	<b>280,4</b>	10,3
JH I		390	<b>294,4</b>	10,5
JH I E	Interner Standard	390	308,4	10,7

Durch unterschiedliche Helium-Flussraten können die Retentionszeiten der einzelnen JH-Homologe im Vergleich zu den in Tabelle 2 angegebenen Werten leicht variieren.



**Abbildung 17:** GC-MS von Agilent (GCD) mit automatischem Probengeber.

Mit Hilfe des Molekulargewichts der JH-Homologe und der Vergleichsflächen von 0,5 pmol JH I-Ethyl und JH III-Ethyl, die zu jeder Hämolympheprobe zugegeben wurden, konnte der JH-Titer berechnet werden. Die Werte wurden in pg JH pro ml Hämolymphe angegeben. Das einzige messbare JH-Homolog in den Hämolympheproben der Schwammspinner-Raupen war JH III, sowohl bei unbehandelten Kontrollen, als auch bei den mit Mikrosporidien infizierten Tieren.

### **Troubleshooting JH-Messungen**

Bei den durchgeführten Messungen wurde bei vielen Proben möglicherweise die Matrix durch die vorhergehenden Reinigungsschritte nicht vollständig abgetrennt. Das kann dazu geführt haben, dass bei vielen Proben Schmutzpeaks auftauchten, die eine Auswertung schwer machten und die Probenanzahl der ersten beiden Ansätze deutlich reduzierte. Aufgrund des fehlenden internen Standards in vielen Proben liegt nahe, dass ein Fehler in der Aufarbeitung gemacht wurde.

In manchen Proben wurden sehr kleine JH-Peaks gefunden, die auch zum Teil mit Schmutzpeaks verbunden waren. Bei manchen Proben weicht die erste Messung deutlich von der zweiten Messung der Probe ab. Das kann an einer Variation beim Injektionsvolumen liegen, doch eine Überprüfung der GC-Apparatur zeigte, dass diese gut funktionierte.

Viele Proben der ersten Ansätze wiesen eine hohe Basislinieninstabilität auf.

Das kann von einer undichten Stelle in der GC-MS-Apparatur kommen. Das System wurde allerdings equilibriert und ergab beim 2. Versuchsansatz trotzdem keine besseren Ergebnisse. Auch ein verunreinigter Injektor oder eben eine verunreinigte Probe können zu einer instabilen Basislinie führen.

Wahrscheinlich wurden im Rahmen der Aufbereitung Substanzen in die Probe verschleppt, die bei der GC-MS-Messung Retentionszeiten ähnlich denen der JH aufwiesen.

Bei der Aufarbeitung des dritten Ansatzes wurde besonderer Wert auf den Silylierungsschritt und den darauf folgenden Reinigungsschritt gelegt. Das ist der einzige Schritt, bei dem die Probe nach der Reinigung durch die  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Säulchen sofort aufgefangen wird und bei den ersten beiden Ansätzen wahrscheinlich verloren ging. Dadurch konnten beim 3. Messansatz in fast allen Proben bessere Standardpeaks und damit aussagekräftigere Messwerte erhalten werden.

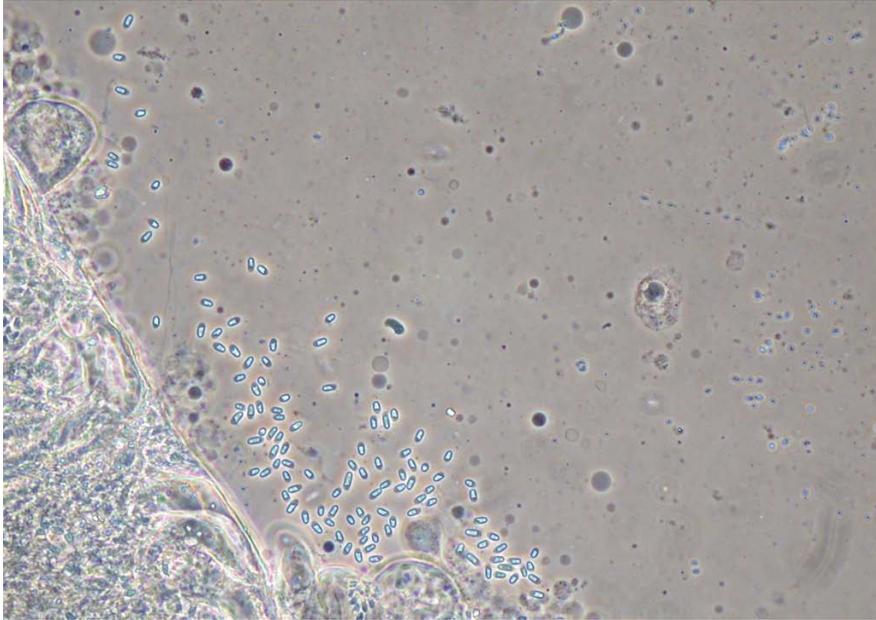
#### ***2.4. Statistische Auswertung***

Die statistischen Datenanalysen wurden mit PASW Statistics 18 für Windows 7.0 ausgeführt. Die Daten wurden mittels Kolmogorow-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Mittels Levene's Test wurde auf Varianzhomogenität der Daten getestet und abhängig von diesen Resultaten mittels t-Test (Student) oder nichtparametrischen Tests wie U-Test (Mann-Whitney) und H-Test (Kruskal-Wallis) getestet ( $\alpha=0,05$ ). Wenn möglich wurde ein paarweiser U-Test als posthoc-Test nach dem H-Test durchgeführt. Dabei wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit je nach Anzahl der Gruppen auf  $\alpha=0,0167$  bei 3 Gruppen und  $\alpha=0,0083$  bei 4 Gruppen korrigiert. Der Zusammenhang zwischen Raupengewicht und JH-Titer bzw. JH-Esterase-Aktivität wurde mittels Spearman Rangkorrelationsanalyse untersucht.

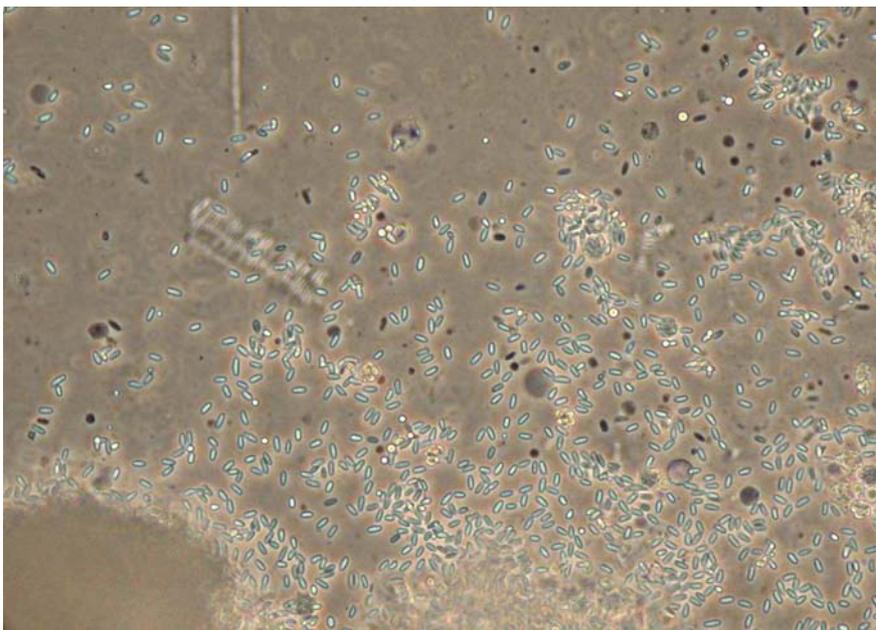
### 3. Ergebnisse

#### ***3.1. Infektionszustand der infizierten Schwammspinner-Raupen***

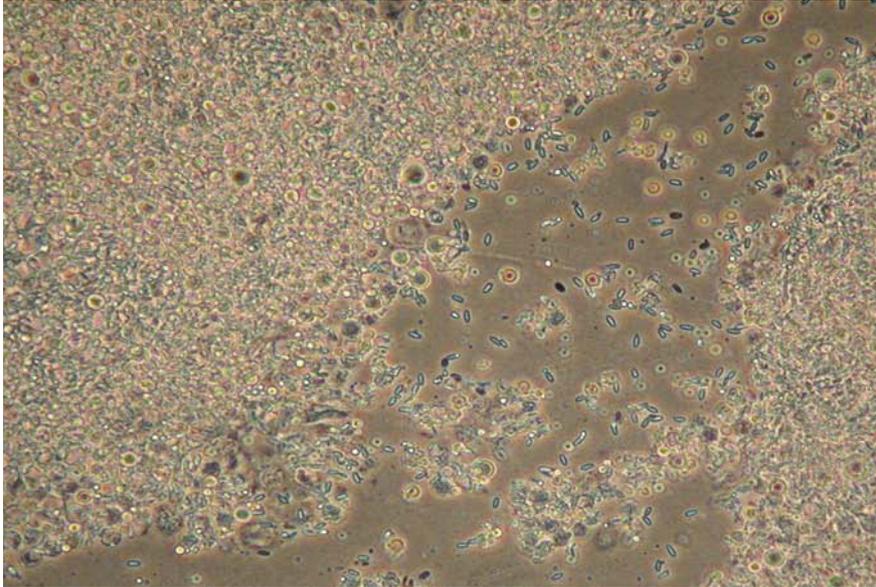
Bei jeder Probennahme wurde zur mikroskopischen Infektionskontrolle von den infizierten Tieren ein Quetschpräparat des Fettkörpers angefertigt. 5 dpi wiesen die Raupen im Allgemeinen beginnende Infektionen durch die Mikrosporidien auf (Abbildung 18). Primärsporen und diplokaryotische Dauersporen waren in allen Quetschpräparaten sofort zu finden. 8 dpi hatte sich bereits ein Teil der infizierten Raupen ins 5. Larvenstadium gehäutet, deshalb wurden sowohl Proben aus infizierten Raupen im L4 und L5 gezogen. Es konnten 8 dpi bei den meisten Raupen bereits mittlere Infektionen festgestellt werden, tendenziell schienen die Raupen im L4 eine etwas stärkere Infektion aufzuweisen als die Tiere, die sich bereits ins L5 weiterentwickelt hatten (Abbildung 19). Zu diesem Zeitpunkt fanden sich im Fettkörper hauptsächlich diplokaryotische Dauersporen. Einzelne Tiere wiesen bereits eine massive Infektion auf. Ab 8 dpi wurde die Hämolymphegewinnung bei der Probennahme der infizierten Tiere schwerer. Das lässt darauf schließen, dass die Tiere aufgrund der Infektion weniger Hämolymphe hatten als die Kontrolltiere. 10 dpi waren alle Kontrollraupen (Abbildung 23) im L5. Tendenziell wiesen die infizierten, leichteren Tiere im 5. Larvenstadium an 10 dpi allerdings bereits starke (Abbildung 20), teilweise sogar sehr starke Infektionen auf. Es waren große Mengen an Primärsporen, diplokaryotischen Dauersporen und auch einkernigen Oktosporen in sporophoren Vesikeln zu finden. 12 und 14 dpi waren in allen Testtieren massive Infektionen festzustellen; bei vielen Tieren war der Fettkörper durch die Infektion bereits extrem stark zersetzt (Abbildung 21). An den meisten Tagen waren in den Präparaten Merontenstadien zu finden (Abbildung 22).



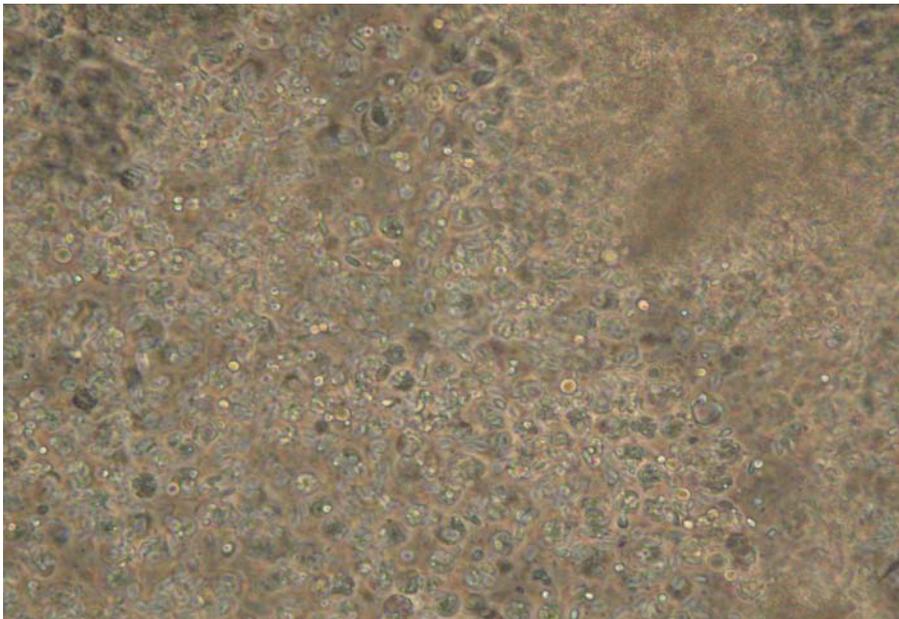
**Abbildung 18:** Anfangsstadium der Infektion an 5 dpi. Wenige Primärsporen waren im Fettkörper und der Spinndrüse zu sehen.



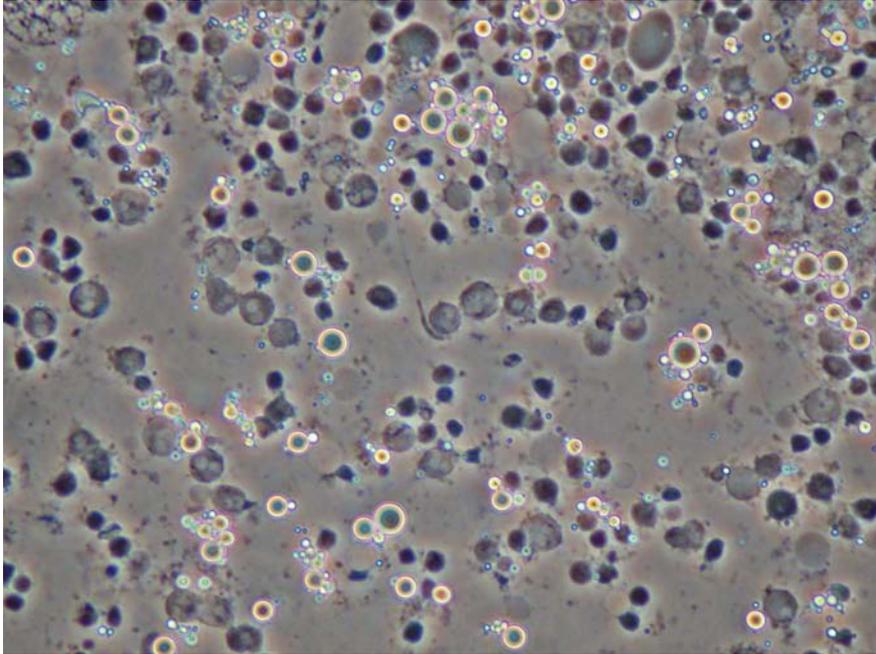
**Abbildung 19:** Infektionszustand 8 - 10 dpi: Es konnten Primärsporen und diplokaryotische Dauersporen gefunden werden, sowie vereinzelte sporophore Vesikel und Merontenstadien.



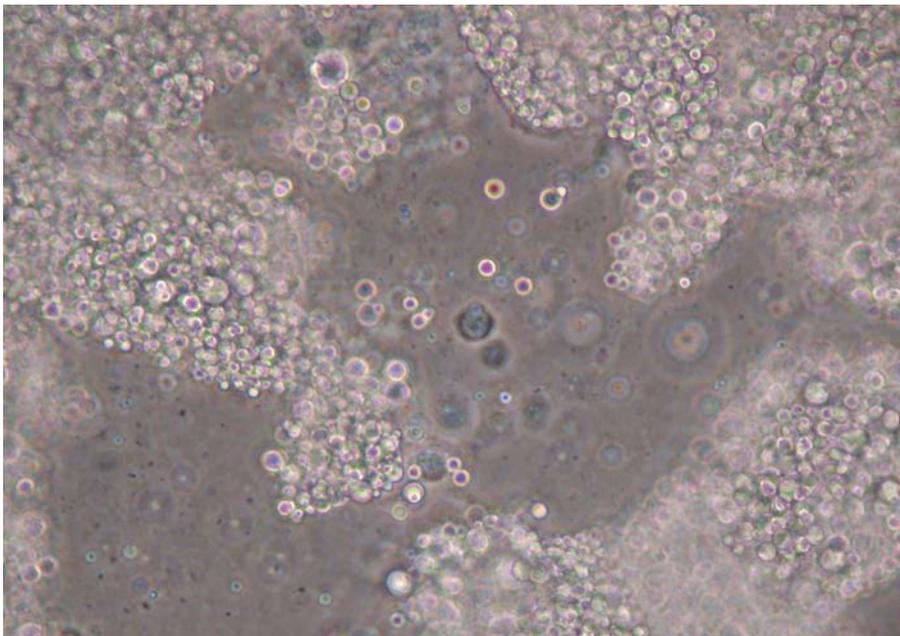
**Abbildung 20:** 10 – 12 dpi wurden starke Infektionen beobachtet. Primärsporen, diplokaryotische Dauersporen und Oktosporen in sporophoren Vesikeln waren in großer Zahl vorhanden.



**Abbildung 21:** 10 dpi war der Fettkörper durch die Mikrosporidieninfektion bereits stark angegriffen und wirkte im Phasenkontrast nicht mehr glänzend. Massen von diplokaryotischen Dauersporen sowie Oktosporen in sporophoren Vesikeln waren zu beobachten.



**Abbildung 22:** Merontenstadien konnten an den meisten Tagen gefunden werden.



**Abbildung 23:** Nicht infiziertes bzw. nicht beeinträchtigttes Fettkörper-Quetschpräparat zum Vergleich.

Bei allen durchgeführten Probennahmen wurde der Infektionszustand jeder Raupe für die Bestimmung der Aktivität der Juvenilhormon-Esterase- und von 2 Raupen jeder Probe zur JH-Bestimmung dokumentiert (Abbildung 18 - Abbildung 23).

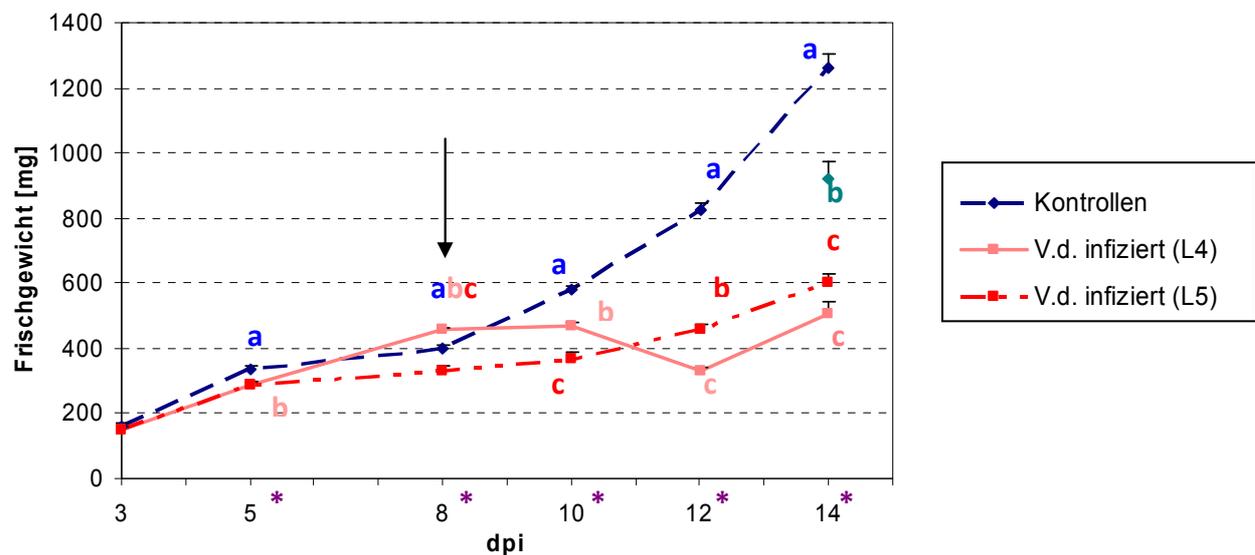
### ***3.2. Raupengewichte bei infizierten und gesunden Tieren***

Je weiter die Infektion durch *Vairimorpha disparis* vorangeschritten war, desto deutlicher wurde, dass die infizierten Tiere leichter als die Kontrolltiere waren (Abbildung 24).

Die Kontrollen häuteten sich meist früher ins nächste Larvenstadium als die infizierte Gruppe, nach der Häutung ins L5 waren die Raupen etwas leichter. Daher konnte am Tag der Häutung der Kontrollen (8 dpi) keine Gewichtsreduktion der Tiere im Vergleich zu ihren infizierten Artgenossen festgestellt werden (Tabelle 3). Ein Teil der Kontrollraupen befand sich 8 dpi noch im L4, diese Tiere häuteten sich aber am darauffolgenden Tag.

**Tabelle 3:** Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler) der Frischgewichte infizierter Raupen und Kontrolltiere, getrennt nach dem Larvenstadium zum Zeitpunkt der Probenahme. Signifikante Unterschiede ( $P < 0,05$ ) laut Kruskal-Wallis Test sind durch Sternchen (\*) markiert.

Tage nach Infektion	3 dpi	5 dpi	8 dpi	8 dpi	10 dpi	10 dpi	12 dpi	12 dpi	14 dpi	14 dpi
<b>Kontrolltiere</b>										
Frischgewicht MW [mg] $\pm$ Standardfehler	159,3 $\pm 9,096$	336,8 $\pm 8,893$	430,3 $\pm 9,871$	345,4 $\pm 15,805$	579,9 $\pm 11,816$	579,9 $\pm 11,816$	825,2 $\pm 23,096$	825,2 $\pm 23,096$	1260,9 $\pm 41,036$	918,98 $\pm 53,938$
Stadium	L4	L4	L4	L5	L5	L5	L5	L5	L5	Präpuppe
n	8	80	102	60	140	140	140	140	18	50
<b>Infizierte Tiere</b>										
Frischgewicht MW [mg] $\pm$ Standardfehler	149,7 $\pm 8,228$	289,4* $\pm 6,576$	456,7* $\pm 7,074$	330,1* $\pm 16,409$	466,5* $\pm 11,545$	365,6* $\pm 22,311$	330,1* $\pm 16,102$	457,5* $\pm 10,100$	505,6* $\pm 38,262$	602,05* $\pm 26,627$
Stadium	L4	L4	L4	L5	L4	L5	L5	L4	L5	L4
n	8	80	150	18	122	36	90	67	18	60
<b>Reduktion in %</b>	6	14	x	4	19	37	60	45	60	35



**Abbildung 24:** Frischgewichte (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler) der gesunden und mit *V. disparis* infizierten Tiere. Stichprobenumfang siehe Tabelle oben. Der türkise Datenpunkt an 14 dpi kennzeichnet die Kontrolltiere, die sich ins Präpuppenstadium gehäutet hatten und paarweise gegen die anderen Gruppen getestet wurden. Bei den infizierten Tieren wurde zwischen 2 Gruppen unterschieden: Manche entwickelten sich ins L5 weiter, andere blieben im L4. Der Pfeil kennzeichnet den Häutungsbeginn der Kontrollraupen ins L5, Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede innerhalb der Tage (Kruskal-Wallis Test). Unterschiedliche Buchstaben deuten auf signifikante Unterschiede (post hoc paarweise U-Tests) innerhalb eines Tages hin.

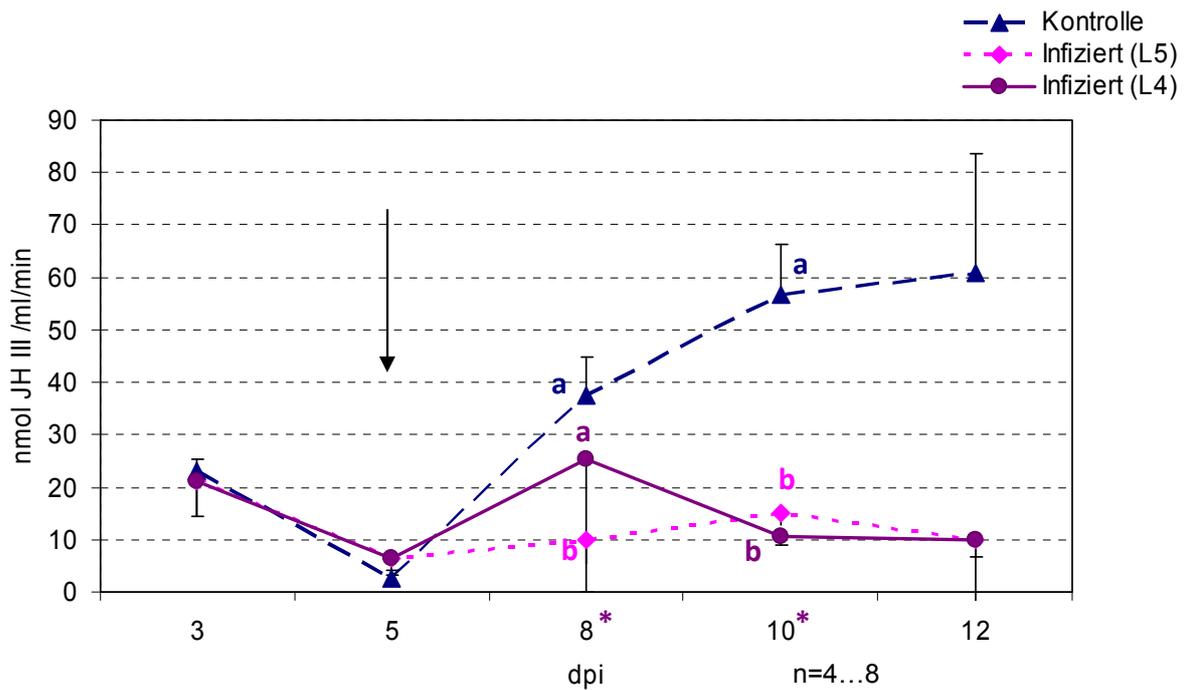
Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten statistischen Tests wurden nur innerhalb der einzelnen Tage durchgeführt. Die statistische Analyse der Gewichtsdaten der Raupen zeigte, dass die Werte ab 8 dpi nicht normalverteilt waren. Varianzgleichheit konnte auch nicht festgestellt werden, außer an 10 dpi ( $p < 0,001$ ), an dem auch mittels t-Test signifikante Unterschiede zwischen infizierten und nicht-infizierten Tieren gezeigt werden konnten.

Durch Testung mittels Kruskal-Wallis H-Test konnten signifikante Unterschiede gezeigt werden ( $p < 0,001$ ). Sortiert nach Tagen fand der Kruskal-Wallis H-Test an allen Tagen außer an 3 dpi ( $p = 0,462$ ) signifikante Unterschiede zwischen Kontrolltieren und infizierten L4 und L5 ( $p < 0,001$ ). An 8 dpi waren die Kontrollen im Vergleich zu den infizierten Tieren im L4 signifikant leichter. Dies resultiert aus der Häutung der Kontrollen ins L5, die bei den meisten Tieren 8 dpi einsetzte. Die paarweise Testung mittels U-Test zeigte in allen Fällen, dass sich die infizierten Larven beider Stadien (L4 und L5) von den Kontrollen unterschieden (Abbildung 24).

### ***3.3. Juvenilhormon-Esterase Aktivität***

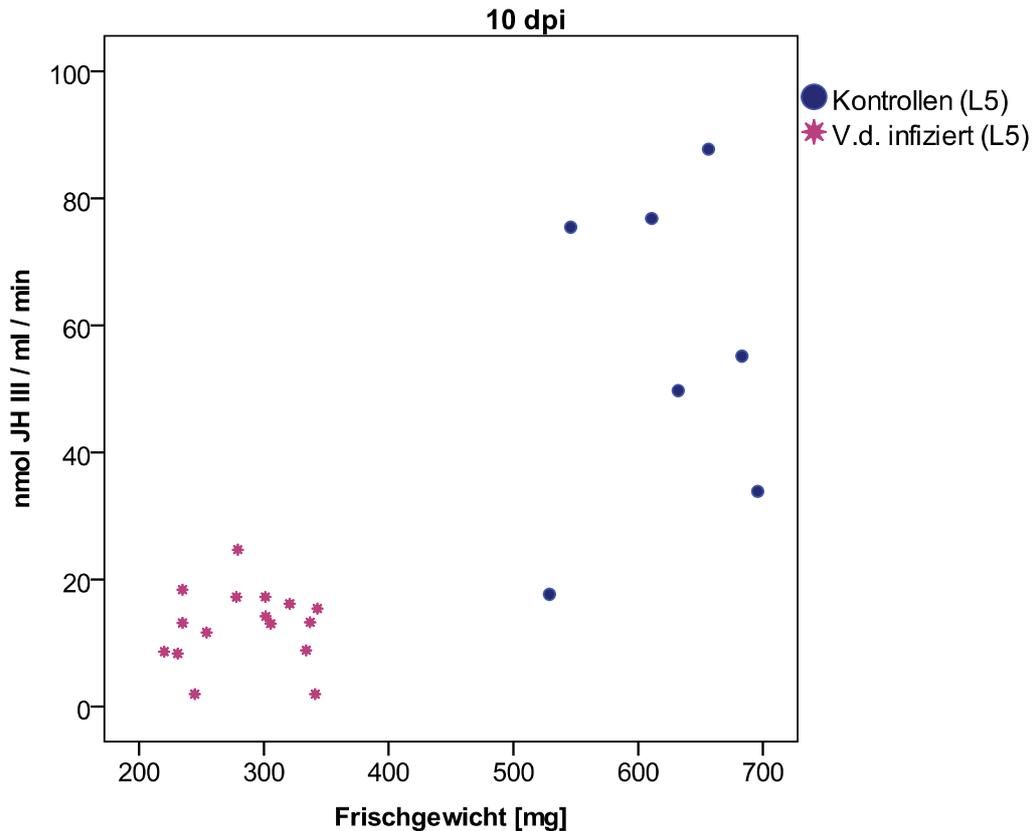
Kurz nach Infektionsbeginn konnten keine signifikanten Unterschiede in der Enzymaktivität zwischen den untersuchten Gruppen gefunden werden. 5 dpi häuteten sich die ersten Kontrolltiere bereits ins 5. Larvenstadium, während der Großteil der infizierten Tiere noch im L4 verblieb. 8 dpi waren alle Kontrollraupen im frühen L5. 10 dpi waren alle Raupen im L5. Bei der Kontrollgruppe stieg die Aktivität der JH-Esterase ab 8 dpi deutlich an (Abbildung 25).

Auch die Aktivität der JH-Esterase der infizierten Tiere im L4 stieg zu diesem Zeitpunkt etwas an. Infizierte Raupen, die sich in das L5 gehäutet hatten, zeigten keinen anhaltenden Anstieg der Aktivität der JH-Esterase.



**Abbildung 25:** Aktivität der JH-Esterase (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler; nmol JH III/ml\*min) in der Hämolymphe infizierter und nicht-infizierter Raupen. Der Pfeil zeigt die Häutung der Kontrollraupen an. Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede laut Kruskal Wallis H-Test ( $p < 0,05$ ). Unterschiedliche Buchstaben deuten auf signifikante Unterschiede (post hoc paarweise U-Tests) innerhalb eines Tages.

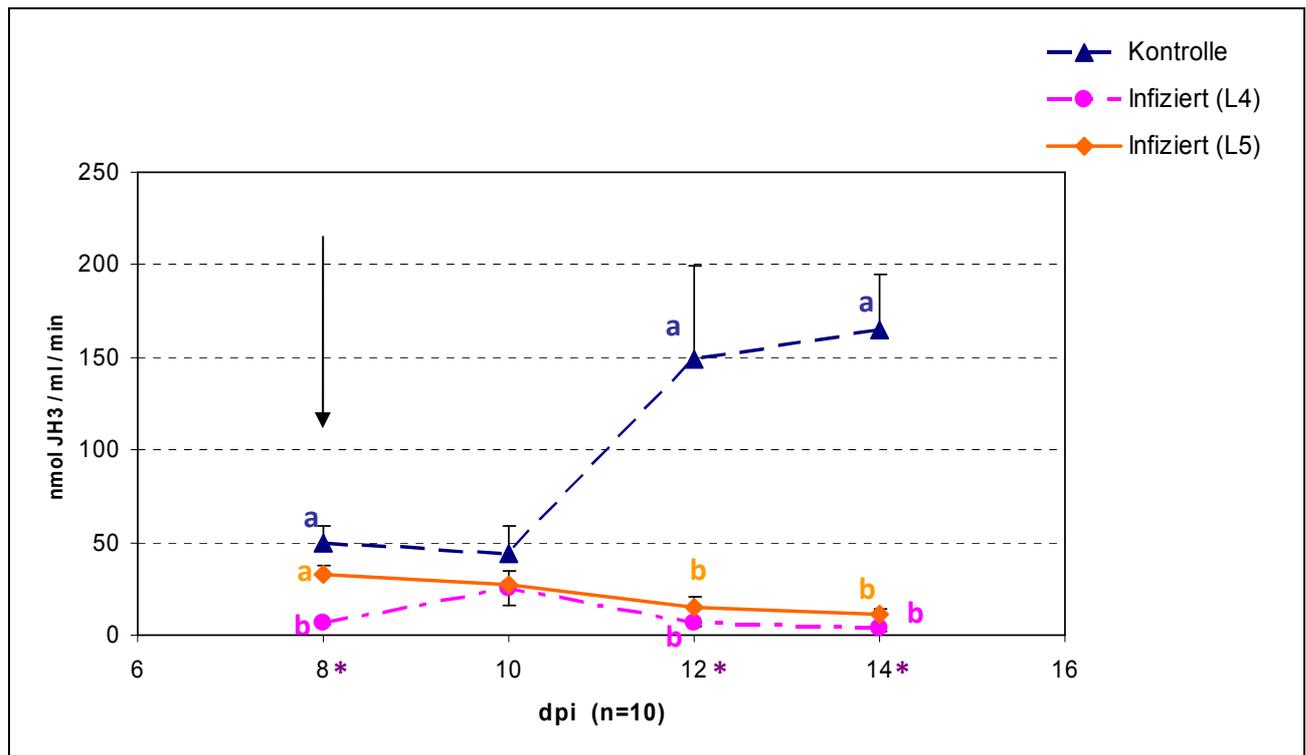
Bei diesem Ansatz handelt es sich um normalverteilte Werte (Kolmogorov-Smirnov-Test: alle  $p > 0,080$ ). Allerdings war eine Varianzgleichheit nur bis 8 dpi gegeben. Daher wurde auch hier auf nichtparametrische Tests zurückgegriffen. Der Kruskal-Wallis H-Test zeigte signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen innerhalb von 8 dpi ( $p = 0,033$ ) und 10 dpi ( $p < 0,001$ ).



**Abbildung 26:** Das Scatterplot-Diagramm von 10 dpi zeigt die Unterschiede in den Aktivitäten der JH-Esterase der Raupen und deren Frischgewicht.

Ein paarweiser U-Test an 8 und 10 dpi zeigte signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den beiden infizierten Gruppen. An 8 dpi unterschieden sich auch die infizierten Tiere signifikant voneinander.

Eine Spearman's rho Korrelationsanalyse dieser ersten Messreihe der Aktivitäten der JH-Esterase zeigte Zusammenhänge zwischen dem Gewicht der Tiere und der Aktivität der JH-Esterase an 8 dpi ( $r=0,505$ ;  $p=0,033$ ) und 10 dpi ( $r=0,650$ ;  $p<0,001$ ) (Abbildung 26).

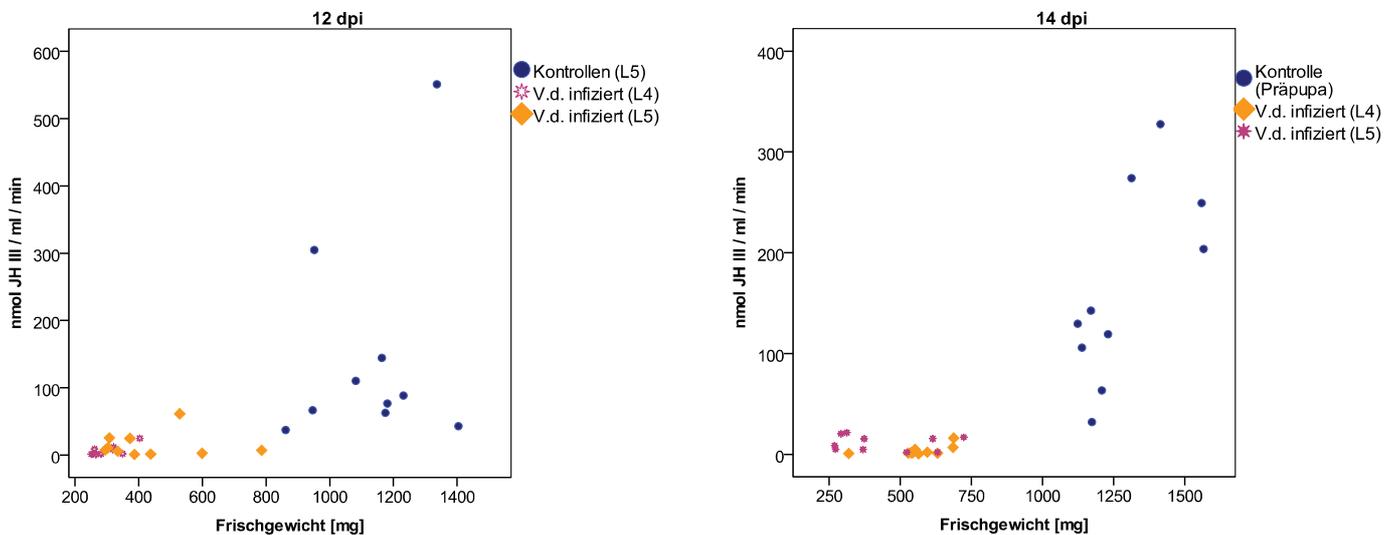


**Abbildung 27:** Aktivitäten der JH-Esterase der zweiten Messreihe mit größerer Probenanzahl (n=10). Der Pfeil kennzeichnet die Häutung der Kontrolltiere ins L5. Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, gezeigt durch den Kruskal Wallis H-Test ( $p < 0,05$ ). Unterschiedliche Buchstaben deuten auf signifikante Unterschiede (post hoc paarweise U-Tests) innerhalb eines Tages.

Beim zweiten Ansatz zur Messung der Aktivität der JH-Esterase wurden über eine längere Zeitspanne mehr Proben als beim ersten Ansatz gezogen. Bis 10 dpi ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (infizierte L4, infizierte L5 und Kontrollen) finden (Abbildung 27). Danach stieg die Aktivität der JH-Esterase in den Kontrolltieren allerdings deutlich an, während die infizierten Tiere weiterhin eine geringe Aktivität der JH-Esterase aufwiesen, unabhängig davon, ob sie sich ins 5. Larvenstadium häuten konnten oder nicht. Die Kontrolltiere waren schwerer als ihre infizierten Artgenossen und wiesen eine höhere Aktivität der JH-Esterase auf.

Der Kolmogorov-Smirnov-Test dieses Ansatzes zeigte keine durchgehende Normalverteilung der Aktivitäten der JH-Esterase an den einzelnen Tagen. Auch nach Ausschluss einer der Gruppen (infizierte L4 oder infizierte L5 im Vergleich mit Kontrollen) war keine Normalverteilung gegeben. Unter Betrachtung aller Tiere (n=30) konnten nur an 8 dpi Varianzgleichheit und ein signifikanter Unterschied mittels t-Test gezeigt werden ( $p < 0,001$ ). Die Auswertung aller Daten erfolgte mit nichtparametrischen Tests.

Der Kruskal-Wallis H-Test zeigte zwischen den drei Gruppen (infizierte L4, infizierte L5, nicht-infizierte Tiere) signifikante Unterschiede innerhalb von 8 dpi ( $p < 0,001$ ), 12 dpi ( $p < 0,001$ ) und 14 dpi ( $p < 0,001$ ).



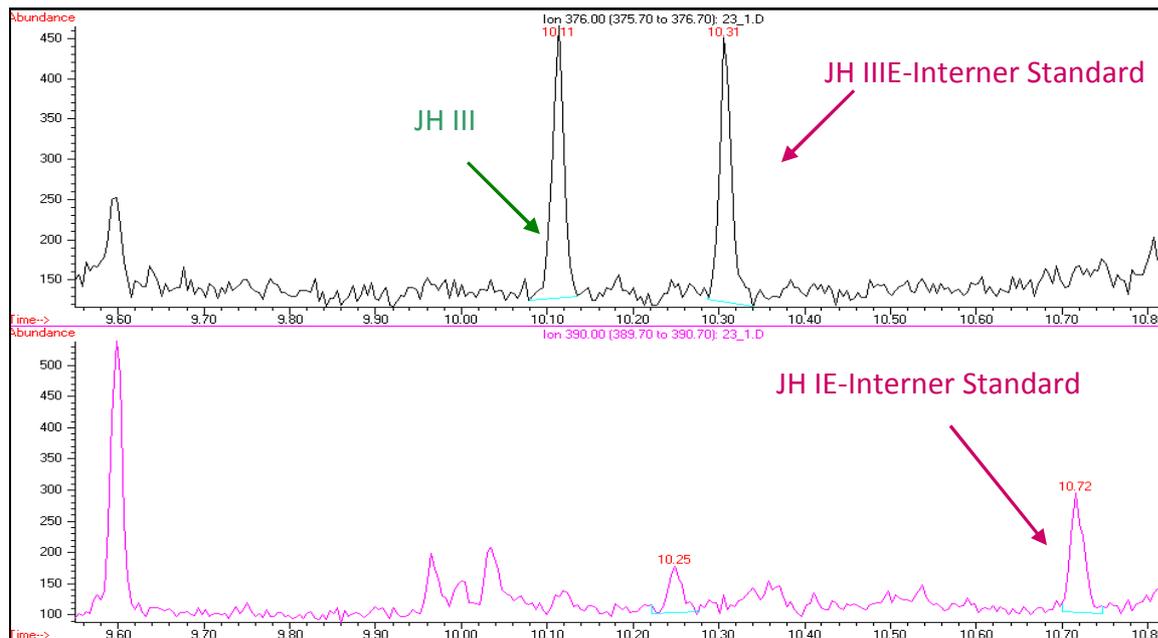
**Abbildung 28 a + b:** Die Scatterplot-Diagramme von 12 dpi und 14 dpi zeigen die Unterschiede in den Aktivitäten der JH-Esterase der Raupen und deren Frischgewicht.

Ein paarweiser U-Test zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den infizierten L4 und den infizierten L5. Allerdings wiesen beide infizierten Gruppen signifikant geringere Aktivitäten der JH-Esterase auf als die Kontrolltiere (Abbildung 27).

Eine Spearman's rho Korrelationsanalyse der einzelnen Tage unter Betrachtung des Raupengewichts und der Aktivität der JH-Esterase zeigte einen möglichen Zusammenhang zwischen Gewicht und Aktivität der JH-Esterase an 12 dpi ( $r=0,736$ ,  $p < 0,001$ ) und 14 dpi ( $r=0,668$ ;  $p < 0,001$ ) (Abbildung 28 a+b).

### 3.4. Juvenilhormonmessungen

Bei der ersten und zweiten Messreihe wurde die Hämolymphe von 5-6 Kontroll- und 4-5 infizierten Raupenproben an 5 dpi, 8 dpi, 10 dpi und 12 dpi aus 10 Raupen je Probe gepoolt. Insgesamt wurde der JH-Titer von 48 Proben gemessen; allerdings fehlten bei 12 Proben die internen Standardpeaks, daher mussten diese Messungen verworfen werden. Außerdem ergaben manche Messungen extrem hohe Werte, die wahrscheinlich von Schmutzpeaks mit gleicher Retentionszeit wie das JH stammten. Das lässt darauf schließen, dass die Aufreinigung nicht optimal funktioniert hat; diese Proben wurden nicht in die Auswertung einbezogen. Die beiden JH-Messungen wurden gemeinsam ausgewertet.



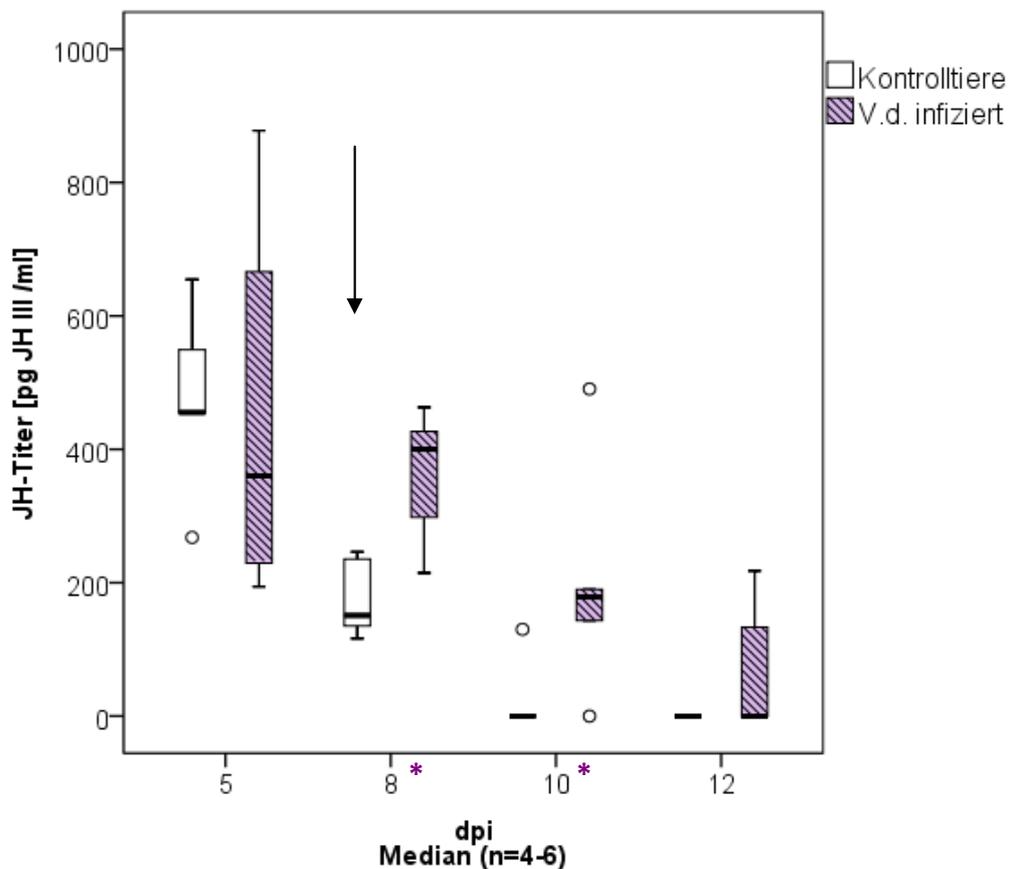
**Abbildung 29** : Chromatogramm einer gepoolten Hämolympheprobe aus Kontrollraupen 5 dpi. Bei den Retentionszeiten von 10,3 und 10,7 min kann man die Peaks der JH-Ethylstandards erkennen. Das in der Hämolymphe gefundene JH III erscheint bei einer Retentionszeit von 10,1 min.

Für diese beiden Messreihen wurden pro Probe 10 Raupen gepoolt. Durch das Poolen der Hämolymphe so vieler Raupen geht natürlich Information verloren, weil man die Proben in diesem Fall nicht nach Einzeltieren auswerten und mit anderen Daten vergleichen kann (z. B. mit dem Gewicht der Tiere). In der Hämolymphe der Schwammspinner konnte nur JH III in unterschiedlichen Mengen gefunden werden (Abbildung 29).

Die Kontrolltiere der beiden Ansätze (I+II) zeigten an 5 dpi einen geringfügig höheren JH III-Spiegel als die infizierten Tiere. 8 dpi war der JH III-Gehalt in den infizierten Tieren ungefähr doppelt so hoch wie in den Kontrolltieren. 10 dpi zeigte sich ein JH III-Titer der infizierten Tiere, der ca. 10 x so hoch war wie bei den Kontrollen. 12 dpi fand sich kein großer Unterschied gegenüber den infizierten Tieren von 10 dpi, bei den Kontrollen war allerdings kein JH III mehr zu finden. 12 dpi befanden sich alle beprobten Tiere der Kontrollgruppe am Beginn des 5. Larvenstadiums, in dem auch kein JH III zu erwarten ist (Tabelle 4, Abbildung 30).

**Tabelle 4:** Mittelwerte (MW), Stichprobenumfang (n) und Standardfehler der ersten beiden JH III-Titer Messreihen im Überblick.

	V.d. infiziert				Kontrollen			
	n	Stadium	MW JH III-Titer [pg JH III / ml]	Standardfehler	n	Stadium	MW JH III –Titer [pg JH III / ml]	Standardfehler
<b>5 dpi</b>	4	L4	447,80	153,51	5	L4	476,40	63,87
<b>8 dpi</b>	5	L4	360,43	45,60	5	L4	176,79	26,77
<b>10 dpi</b>	5	L4	200,47	80,59	6	L4 & L5	21,67	21,67
<b>12 dpi</b>	4	L4 & L5	175,37	59,67	6	L5	0	0



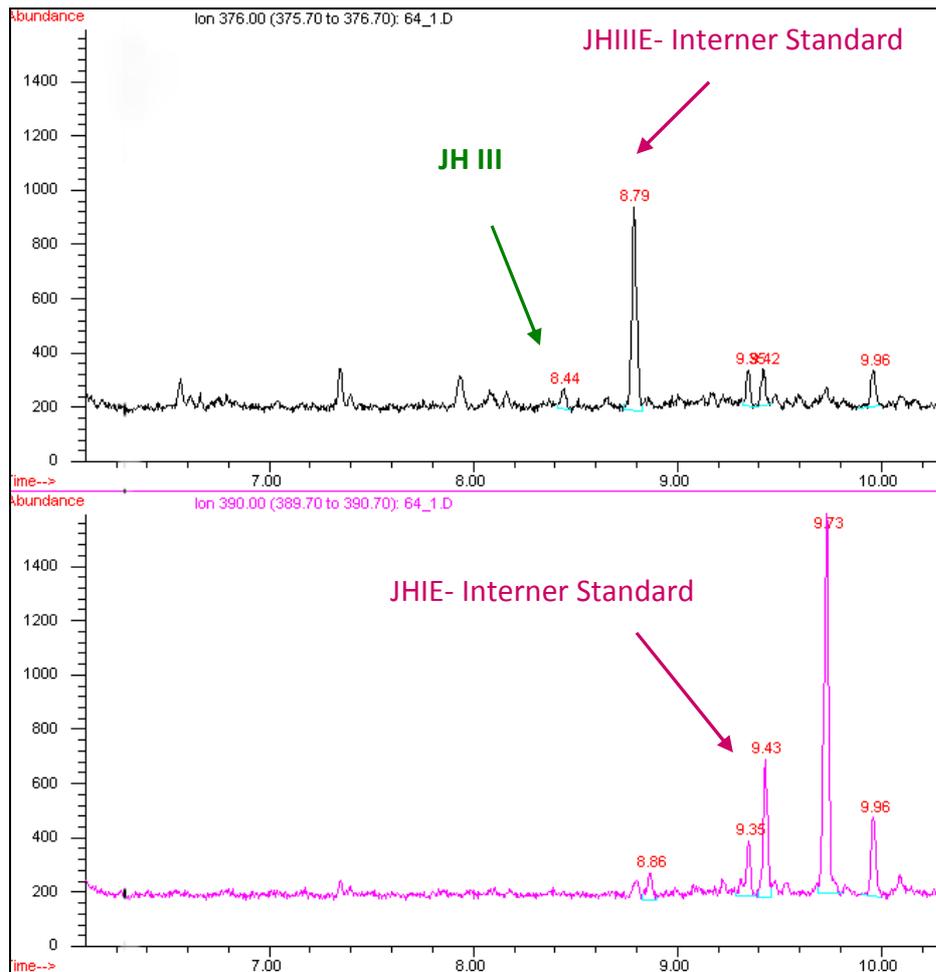
**Abbildung 30:** Übersicht über die Ergebnisse der JH III-Messungen der ersten beiden Ansätze. Der Pfeil kennzeichnet die Häutung der Kontrolltiere. Die Sterne kennzeichnen signifikante Unterschiede, laut Mann Whitney U-Test ( $p < 0,05$ ).

Der Kolmogorov-Smirnov Test der ersten beiden Ansätze zeigte, dass ab 10 dpi keine Normalverteilung der Werte an den einzelnen Probennahmetagen mehr gegeben war (n=4...6 /Gruppe). Der Levene's Test zeigte Varianzgleichheit an 5, 8 und 10 dpi und der t-Test zeigte an 8 dpi (p=0,008) und an 10 dpi (p=0,043) signifikante Unterschiede zwischen infizierten und Kontrolltieren. An 8 dpi und 10 dpi zeigte ebenso der Mann-Whitney U-Test signifikante Unterschiede im JH III-Titer der beiden Gruppen (p=0,032; p=0,030).

Die Spearman's rho Korrelationsanalyse zeigte einen möglichen negativen Zusammenhang zwischen JH-Titer und Gewicht an 10 dpi (r=-0,788; p=0,004).

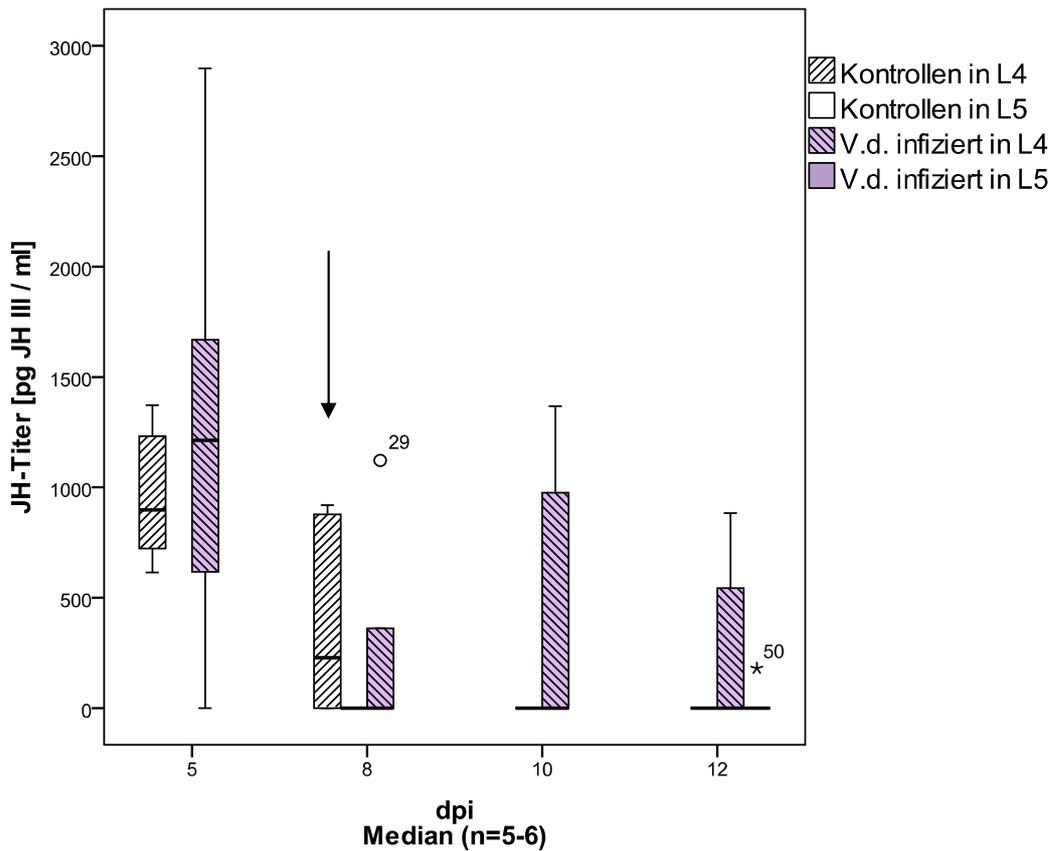
Bei der 3. Messreihe wurde der JH-Titer in der Hämolymphe von Einzelraupen bestimmt (20 µl pro Probe). Die Qualität der Chromatogramme konnte damit verbessert werden, allerdings waren die Chromatogramme aufgrund der niedrigen Konzentrationen schwer auswertbar (Abbildung 31). Die Konzentration des JH in den Proben war deutlich höher als in den ersten beiden Messreihen, wo der JH-Titer an gepoolten Proben bestimmt worden war (Tabelle 5, Abbildung 32).

Das kann daran liegen, dass kein JH bei der Aufreinigung der Proben in den ersten beiden Ansätzen verloren ging. Eine weitere Erklärung wäre, dass das GC aufgrund der geringeren Hämolympfmenge und der daraus resultierenden geringeren Verschmutzung der Proben sensibler messen konnte. Die Basislinie bei dieser Messreihe war viel stabiler als bei den ersten beiden Ansätzen. Obwohl bei den gepoolten Proben darauf geachtet wurde, dass gleiche Entwicklungsstadien für eine Probe gepoolt wurden, kann der genaue Entwicklungsstand (und der damit einhergehende JH-Gehalt) der gepoolten 10 Raupen sehr unterschiedlich sein und so insgesamt zu niedrigeren JH-Titern führen.



**Abbildung 31:** Chromatogramm einer Probe der 3. JH-Messreihe. Diese Probe stammt von einer mit *V. disparis* infizierten **Einzelraupe** im L4, 10 dpi.

Auch diese Messreihe zeigte JH III als einziges, in sehr geringen Mengen vorkommendes Juvenilhormon in der Raupenhämolymphe.



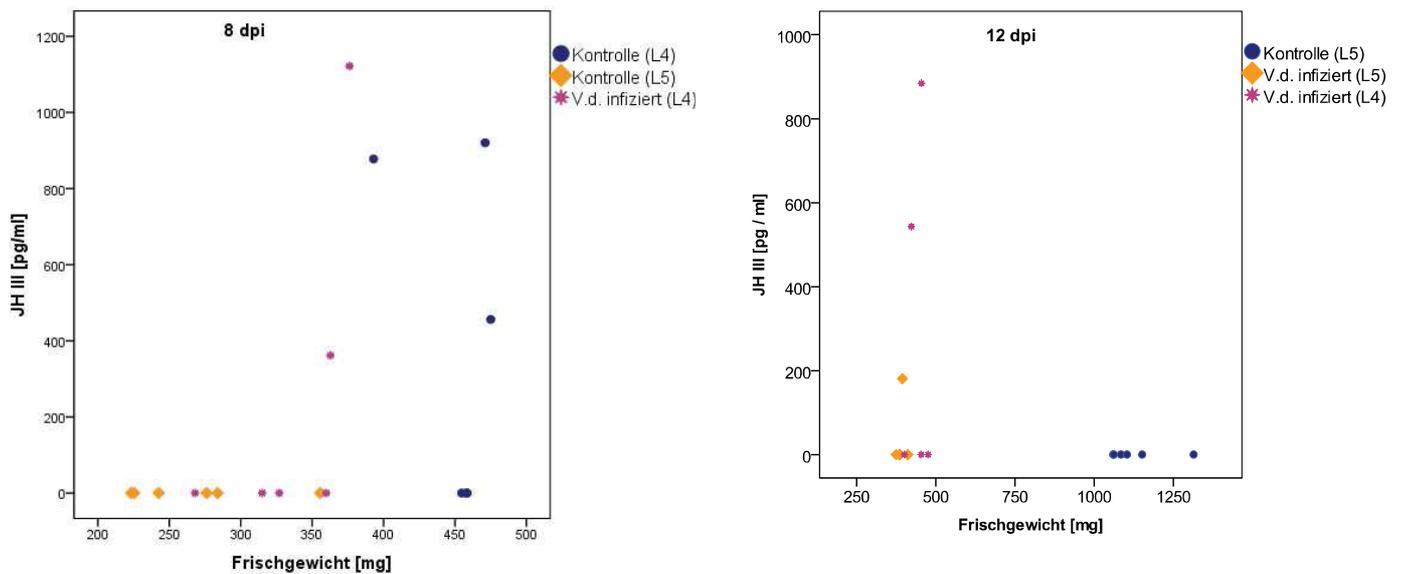
**Abbildung 32:** Ergebnis der 3. JH-Messreihe mit Einzeltieren. Der Pfeil kennzeichnet die Häutung der Kontrolltiere.

**Tabelle 5:** Mittelwerte (MW), Stichprobenumfang (n), Larvenstadien und Standardfehler der 3. JH III-Titer-Messreihe im Überblick.

	V.d. infiziert				Kontrollen			
	n	Stadium	MW JH III-Titer [pg JH III / ml]	Standardfehler	n	Stadium	MW JH III -Titer [pg JH III / ml]	Standardfehler
5 dpi	6	L4	1268,34	408,9779	5	L4	968,15	145,4706
8 dpi	6	L4	247,25	184,6198	6	L4	375,68	180,6113
8 dpi					6	L5	0	0
10 dpi	6	L4	390,66	252,2142	6	L5	0	0
12 dpi	5	L5	36,10	36,1041	6	L5	0	0
12 dpi	5	L4	285,47	182,9412				

Die statistische Auswertung mittels Kolmogorov-Smirnov Test zeigte keine normalverteilten Werte außer an 5 dpi ( $p=0,2$ ) und keine Varianzgleichheit (Levene's Test).

Der Kruskal-Wallis H-Test (3 Gruppen: Infizierte L4, Infizierte L5 und Kontrollen, sortiert nach Tagen) zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den infizierten Tieren und den Kontrolltieren. Gegenüber den nicht infizierten Tieren fanden sich 10 dpi und 12 dpi allerdings leicht erhöhte JH-Titer (nicht signifikant, Abbildung 32). Bei den Kontrolltieren, die sich bereits im L5 befanden, war der JH-Titer bei allen Proben unter der Nachweisgrenze.



**Abbildung 33 a + b:** Scatterplot-Diagramme der JH-Einzelraupen-Titerbestimmung Ansatz III und deren Frischgewicht 8 dpi und 12 dpi.

Die Spearman's rho Korrelationsanalyse wies auf mögliche Zusammenhänge zwischen Gewicht und JH-Gehalt an 8 dpi ( $r = 0,555$ ;  $p = 0,017$ , Abbildung 33 a) und 10 dpi ( $r = -0,640$ ;  $p = 0,025$ ) hin. Unterschiedliche Larvenstadien der **infizierten Tiere** konnten bei diesem Ansatz allerdings nur an 12 dpi beprobt werden (Abbildung 33 b). Zusammenfassend wurden in allen Messreihen zur Aktivität der JH-Esterase (H-Test) und der ersten JH-Titerbestimmung (U-Test) signifikante Unterschiede gefunden (Tabelle 6).

**Tabelle 6:** Übersicht über die Ergebnisse der statistischen Auswertungen. Bei allen Messungen wurde mittels H-Test getestet, außer bei JH-Titer Ansatz I+II, bei dem der U-Test verwendet wurde (2 Gruppen). An den mit x gekennzeichneten Tagen wurde keine Untersuchung vorgenommen. n.s. = Testergebnis nicht signifikant.

	3 dpi	5 dpi	8 dpi	10 dpi	12 dpi	14 dpi
<b>Frischgewicht</b>	n.s.	$p < 0,001$				
<b>JH-Esterase Ansatz I</b>	n.s.	n.s.	$p = 0,033$	$p < 0,001$	n.s.	x
<b>JH-Esterase Ansatz II</b>	x	x	$p < 0,001$	n.s.	$p < 0,001$	$p < 0,001$
<b>JH-Titer Ansatz I + II</b>	x	n.s.	$p = 0,032$	$p = 0,030$	n.s.	x
<b>JH-Titer Ansatz III</b>	x	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	x

#### 4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden das Frischgewicht, die Aktivität der JH-Esterase und der JH-Titer von Schwammspinnerraupen bei einer Infektion mit *V. disparis* genauer untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit *V. disparis* ab 5 dpi zu signifikanten Frischgewichtsunterschieden im Vergleich zu gesunden Raupen führt. Weiters wurde erstmalig eine signifikant niedrigere Aktivität der JH-Esterase in infizierten als in nicht-infizierten Larven dokumentiert. Es konnte in einem Ansatz aus gepoolten Messungen an 2 Tagen ein etwas höherer JH III-Titer in infizierten Raupen gemessen werden.

Ab 5 dpi wurden signifikante Unterschiede im Gewicht von infizierten und nicht infizierten Raupen gemessen, in allen infizierten Raupen konnte eine beginnende Infektion festgestellt werden. Schon zu diesem Zeitpunkt schienen die Mikrosporidien die Entwicklung der Schwammspinner zu beeinträchtigen: Das Frischgewicht der Testraupen hängt mit dem Infektionszustand zusammen. Die mikroskopische Bestimmung des Infektionszustandes der Larven bei der Probennahme ließ vermuten, dass Larven mit noch schwächeren Infektionen sich auch schneller weiter ins L5 häuteten als solche mit fortgeschrittenen Infektionen, allerdings verzögert im Vergleich zu den Kontrollraupen. Diese Beobachtung bestätigt die Beobachtungen von Hoch und Schopf (2001). Auch in deren Versuchen verursachte die *Vairimorpha*-Infektion eine Verlangsamung der Wirtsentwicklung und resultierte in einer extremen Wachstumsreduktion im 4. Stadium.

Es gibt die Ansicht, dass für die Häutung ins Puppenstadium ein kritisches Gewicht erreicht werden muss. Beim kritischen Gewicht stellen die Corpora allata ihre JH-Sekretion ein, die JH-Esterase wird aktiv, um das JH abzubauen, erst dann wird die nächste Häutung eingeleitet (Davidowitz und Nijhout, 2004; Ochieng-Odera et al., 1994; Sparks et al., 1993). Mikrosporidien beeinträchtigen das Frischgewicht ihrer Wirte signifikant. Es könnte also sein, dass die infizierten Raupen sich nicht ins Puppenstadium häuten konnten, da sie das zur Häutung notwendige kritische Gewicht nicht erreichten und die Corpora allata weiter JH abgab.

Auch durch einen verringerten JH-Metabolismus kann es zu erhöhten JH-Titern in den infizierten Larven kommen: Erstmals konnte in meiner Arbeit der Einfluss einer Mikrosporidieninfektion auf die JH-Esterase der Wirtsinsekten nachgewiesen werden: In beiden Messansätzen wurde festgestellt, dass die Aktivität der JH-Esterase bei den

Kontrollraupen im Laufe des fünften Larvenstadiums zunimmt, bei infizierten Larven jedoch stagniert oder leicht abnimmt. Lepidopteren haben im Laufe ihrer Entwicklung meist 2 JH-Esterase-Aktivitätspeaks (Gupta, 1990; Jones et al., 1982). Die Aktivität dieses Enzyms soll das JH aus der Hämolymphe der Insekten eliminieren, damit wird eine Weiterentwicklung ins Puppen- und danach ins Adultstadium möglich (Jones et al., 1982; de Kort und Granger, 1981). Im Schwammspinner ist die JH-Esterase das einzige JH-abbauende Enzym in der Hämolymphe. Eine verringerte Aktivität dieses Enzyms kann damit einen höheren JH-Titer verursachen, womit die Häutung ins Puppen- oder Adultstadium verhindert wird oder es zu einer weiteren Larvalhäutung kommt (Nussbaumer, 1998). Am Beginn des letzten Larvenstadiums beobachten Jones et al. (1982) keine hohe Aktivitäten der JH-Esterase. Die intakte JH-Esterase baut am Ende des L4 das JH in den Larven ab und ermöglicht damit eine Häutung ins L5. Wird ihre Aktivität z. B. aufgrund einer Parasitierung verhindert, wird das JH in der Hämolymphe nicht abgebaut und die Larvalhäutung verzögert (Hayakawa, 1990; Edwards et al., 2001).

Im ersten Versuchsansatz wurde bei den infizierten Raupen, die sich nicht wie die Kontrollgruppe 5 dpi ins fünfte Stadium häuteten, 8 dpi ein leichter Anstieg der JH-Esterase-Aktivität gemessen. Die infizierten Raupen, die sich bereits gehäutet hatten, zeigten 8 dpi keinen Anstieg der Enzymaktivität in der Hämolymphe. Ein Grund dafür ist, dass am Beginn eines Larvalstadiums keine Häutung stattfinden wird und die JH-Esterase daher nicht aktiv ist, um das JH zu spalten. Es kann mehrere Erklärungen für die niedrigere JH-Esterase-Aktivität der infizierten Raupen geben: Versuche an Larven von *Manduca sexta* zeigten, dass eine deutlich verminderte Aktivität der JH-Esterase eine Folge von Hungerphasen sein kann. Auch bei *Trichoplusia ni* konnte durch Hungerphasen eine verminderte Aktivität der JH-Esterase nachgewiesen werden (Anspaugh und Roe, 2005; Venkatesch und Roe, 1989; Jones et al., 1990). Dies resultiert in einem erhöhten JH-Titer der Raupen (Jones et al., 1990). Beim Schwammspinner wurde beobachtet, dass sogar eine schlechte Nahrungsqualität zu niedrigeren Aktivitäten der JH-Esterase führen kann. Dies führt man darauf zurück, dass dem Tier durch die schlechtere Nahrung weniger Ressourcen zur Verfügung stehen, die aber für eine erfolgreiche Häutung notwendig sind, und dadurch die Metamorphose verzögert wird (Schafellner et al., 2007).

Die drei gemessenen Gruppen (Kontrollraupen, infizierte Larven im L4, infizierte Larven im L5) zeigten signifikante Unterschiede in der Aktivität der JH-Esterase, wobei diese bei den

Kontrollraupen deutlich höher war als bei den infizierten Raupen. Im zweiten Versuchsansatz entwickelten sich die Raupen langsamer, die Häutung der Kontrollgruppe setzte erst 8 dpi ein. Allerdings wurde bei den Kontrollraupen wiederum 3 Tage nach deren Häutung ein deutlicher Anstieg der Aktivität der JH-Esterase gefunden, was auf eine Weiterentwicklung der Kontrollraupen ins nächste Stadium hindeutet. Auch in diesem Ansatz konnte bei den bereits gehäuteten, infizierten L5 kein Anstieg der Aktivität der JH-Esterase beobachtet werden. 8, 12 und 14 dpi unterschieden sich die Enzymaktivitäten der Kontrollgruppe und der infizierten Raupen signifikant voneinander. Bei Betrachtung der unterschiedlichen Larvenstadien und deren JH-Esterase-Aktivitäten konnten in den beiden Ansätzen keine Besonderheiten oder Unterschiede zwischen den infizierten Raupen im L4 bzw. im L5 beobachtet werden.

Es sind viele Beispiele bekannt, in denen Parasitoide den JH-Titer ihrer Lepidopteren-Wirte erhöhen und damit deren Entwicklung verlängern (Edwards et al., 2001). In Versuchen mit den Wirt-Parasitoid-Systemen *M. sexta* - *C. congregata* sowie *L. dispar* - *G. liparidis* konnte bestätigt werden, dass die Parasitoidenlarven das JH selbst an ihre Wirte abgeben und damit ihre Weiterentwicklung beeinflussen (Schafellner et al., 2004; Cole et al., 2002; Beckage, 1997). Weiters kommt es zu einer Beeinflussung der Endokrinologie der Wirte durch Polydnaviren und Venom, welche die Parasitoide während der Eiablage in den Wirt injizieren, sowie durch die aus der Serosa des Eies gebildeten Teratocyten (Webb et al., 2001). Polydnaviren (PDV) sind symbiontische Viren, die sich in den Calyxzellen von verschiedenen Ichneumoniden und Braconiden replizieren. Die Expression der Virusgene im Wirt beeinflusst dessen Immunsystem und verhindert die vollständige Entwicklung der Wirte, allerdings vermehren sich die Viren nur in Parasitoiden (Webb et al., 2001).

Es gibt Untersuchungen, dass z. B. PDV verschiedener Wespen das Wachstum und die Entwicklung ihres Wirtes aufhalten. Schon die Injektion von PDV und Teratocyten in den Wirt alleine (z. B. PDV aus *Cotesia congregata* oder *Campoletis sonorensis*) führt zu verschiedenen Entwicklungsstörungen, die auch in normal parasitierten Wirtslarven gefunden werden können (Webb et al., 2001; Beckage, 1997; Dushay und Beckage, 1993).

*Glyptapantheles liparidis* beeinflusst die Endokrinologie und das Immunsystem ihres Wirtes *L. dispar* ebenfalls auf diese Weise. PDVs und Venom werden mit der Eiablage in den Schwammspinner injiziert. Das zelluläre Immunsystem des Wirtes wird unterdrückt, die Parasiten sind vor Einkapselung geschützt und eine Entwicklungsverzögerung der

Wirtsraupen wird ausgelöst (Schafellner et al, 2007; Tillinger et al., 2004). Die Parasiten erhöhen den JH-Titer ihres Wirtes signifikant, wodurch die Raupen im Larvenstadium verbleiben. Sie verändern aber nicht nur den JH-Titer ihres Wirtes, sondern auch die relativen Konzentrationen der JH-Homologe (Schafellner et al, 2007; Cole et al., 2002). Untersuchungen ergaben außerdem, dass von *G. liparidis* parasitierte Raupen signifikant niedrigere Aktivitäten der JH-Esterase in der Hämolymphe aufwiesen. Im Gegensatz zu den gesunden Raupen wurden keine Aktivitätspeaks gefunden. Die Beeinflussung der Aktivität der JH-Esterase resultiert aus der PDV-Abgabe bei der Eiablage der Parasitoide (Schafellner et al., 2007). Bei von Nussbaumer (1998) durchgeführten Versuchen wurde der Einfluss der nahe verwandten Art *Glyptapantheles porthetriae* auf *L. dispar* untersucht. Durch die Verringerung der Aktivität der JH-Esterase am Beginn des L4 kam es auch in diesen Versuchen zu einer Wachstumshemmung der Wirtsraupen, wodurch die Entwicklung der Wespen günstig beeinflusst wurde (Nussbaumer, 1998). Eine Hinunterregulation der JH-Esterase-Aktivität ist auch für andere Wirt-Parasitoid-Beziehungen bekannt, wie z. B. *Manduca sexta* – *Cotesia congregata* (Beckage und Riddiford, 1982), *Pseudaletia separata* – *Cotesia kariyai* (Hayakawa, 1995), oder *Lacanobia oleracea* – *Eulophus pennicornis* (Edwards et al., 2006).

Auch *V. disparis* verbringt die gesamte Entwicklung in einer Wirtslarve, eine Verlängerung von deren Entwicklung wie durch die oben genannten Endoparasitoide könnte daher auch für die Mikrosporidien günstig sein. Dass sie ähnliche Wege wie die Braconiden gehen, scheint doch eher unwahrscheinlich. Prinzipiell könnte eine Verringerung der Aktivität der JH-Esterase vor allem für Mikrosporidien wie *V. disparis* günstig sein, für die eine vertikale Übertragung keine oder nur eine sehr geringe Rolle spielt, da der Hauptinfektionsweg von *V. disparis* über Sporen aus abgestorbenen Raupen geschieht (Goertz und Hoch, 2008 a). Die Sporenmenge von *V. disparis* nimmt in Schwammspinnerkadavern mit späterem Todeszeitpunkt signifikant zu (Hoch, 1999), dadurch bedingt, dass die Raupen noch wachsen können und schwerere Raupen mehr Sporen enthalten (Goertz und Hoch, 2008 a). Oftmals verläuft eine Larvalhäutung bei mit *V. disparis* infizierten Raupen letal (Hoch und Schopf, 2001), d. h. ein Hinauszögern der Häutung verlängert das Leben infizierter Raupen und führt möglicherweise zu einer höheren Sporenbildung. Die Verringerung der Aktivität der JH-Esterase in infizierten Raupen könnte entweder aktiv oder passiv als Nebeneffekt der

Mikrosporidiose passieren. Eine gewisse Reduktion der JH-Esterase muss sich allerdings nicht zwingend in einem deutlichen Anstieg des JH-Titers auswirken.

Eine verlängerte Entwicklungszeit des Wirtstieres kann durch die physiologische Manipulation eines Parasiten ausgelöst werden. Bei endoparasitischen Wespen werden entweder Ecdysteroide oder JH manipuliert. Doch auch eine erhöhte Biosyntheserate und ein reduzierter Katabolismus des Schwammspinners können zu diesen Symptomen führen (Down et al., 2008, Schafellner et al., 2007; Schafellner et al., 2004; Edwards et al., 2001; Hayakawa, 1990). Nur an zwei Tagen war der JH-Titer der infizierten Raupen im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollen signifikant erhöht: 8 dpi und 10 dpi fanden sich bei den ersten beiden Messreihen signifikante Unterschiede zwischen den infizierten Raupen und den Kontrollraupen. Bei den Kontrollraupen, die sich 10 dpi im L5 befanden, konnte ab 8 dpi ein deutliches Absinken des JH-Titers festgestellt werden, was bei den infizierten Raupen, die noch alle im L4 waren, an diesem Tag noch ausblieb. Allerdings begann der JH-Titer der infizierten Larven im L4 danach ebenfalls leicht zu sinken. 10 dpi war bei den Kontrollraupen (im L5) kein JH nachweisbar. Im Vergleich dazu war bei den infizierten Raupen der JH-Titer allerdings signifikant erhöht. Die infizierten Raupen befanden sich alle noch im L4. 12 dpi waren nicht genug auswertbare Proben der Kontrollraupen vorhanden, womit in den ersten beiden Ansätzen an diesem Tag keine zuverlässige Aussage über den JH-Titer der Raupen getroffen werden konnte. Bei der dritten Messreihe konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen infizierten Raupen und Kontrollraupen gefunden werden. Allerdings fiel bei allen Kontrollraupen der JH-Gehalt bis zur Häutung deutlich ab. Die Kontrollraupen, die sich später häuteten, zeigten einen langsameren Abfall des Juvenilhormons. Der JH-Gehalt der infizierten Raupen sank simultan, wenn auch langsamer als bei den Kontrollraupen. Infizierte Larven, die sich noch nicht ins L5 häuten konnten, zeigten geringfügig höhere Juvenilhormongehalte als ihre infizierten Artgenossen, die sich bereits gehäutet hatten. Bei den Raupen, die sich nicht häuteten, waren außerdem stärkere Infektionen als bei den anderen infizierten Larven zu beobachten. Es liegt nahe, dass die Raupen zum Zeitpunkt der Probennahme vielleicht schon so stark durch die Infektion beeinträchtigt waren, dass die JH-Esterase ihre Funktion verlor und das JH in der Hämolymphe nicht abbauen konnte. Eine Mikrosporidieninfektion könnte für die Schwammspinnerraupen eine dem Hunger ähnliche Situation hervorrufen, da den Larven durch den Ressourcenverbrauch der Pathogene ja Nährstoffe in beträchtlichem Ausmaß

entzogen werden (Hoch et al., 2002). Das könnte, wie oben bereits dargestellt wurde, eine niedrigere Aktivität der JH-Esterase zur Folge haben und eine verzögerte Weiterentwicklung erklären.

Fisher und Sandborn (1962) vermuteten aufgrund ihrer experimentellen Arbeiten, dass Mikrosporidien direkt in das endokrine Gleichgewicht ihres Wirts eingreifen können oder selbst möglicherweise JH-ähnliche Substanzen produzieren. Die Produktion JH-ähnlicher Substanzen erscheint allerdings für Mikrosporidien, deren Metabolismus und Morphologie hochreduziert ist, sehr unwahrscheinlich. Down et al. (2008) wiesen in Experimenten mit *Vairimorpha necatrix* erstmals einen erhöhten JH-Titer in infizierten Wirtsraupen nach. Auch dieses Mikrosporidium verlängert die Entwicklung des Wirtslarvenstadiums. Befällt *V. necatrix* Raupen von *Lacanobia oleracea*, ähneln die Symptome somit einem Parasitoidenbefall (Down et al., 2008). Im Versuch mit *L. oleracea* wurden JH II als dominantes JH sowie Spuren an JH I in Ganzkörperproben gemessen. Am 2. Tag im L6 (= letztes Larvenstadium) wurde in infizierten Larven ca. 100 x so viel JH II gefunden als in den Raupen der Kontrollgruppe. Ein direkter Vergleich von Hämolymp- und Ganzkörper-JH-Titern ist schwierig (Edwards et al., 1995). Diese dramatisch erhöhten JH-Titer konnten in unseren Versuchen bei *L. dispar* nicht bestätigt werden, 8 dpi war der JH-Titer in den infizierten Larven doppelt so hoch wie bei der Kontrollgruppe, 10 dpi wurde in den infizierten Raupen ca. 10 x so viel JH III gefunden als bei den Kontrollraupen. Weiters wurde durch Down et al. (2008) beobachtet, dass normal entwickelte Raupen der Kontrollgruppe ein signifikant höheres Gewicht aufwiesen als infizierte Raupen und das L5 und L6 der infizierten Raupen verlängert war. Das konnte auch bei der Infektion von *L. dispar* mit *V. disparis* beobachtet werden. Down et al. (2008) folgerten aus ihren Beobachtungen, dass die Fähigkeit der Mikrosporidie, das letzte Stadium zu verlängern und so die Verpuppung aufzuhalten, adaptiv ist. *V. necatrix*-Sporen werden wie die Sporen von *V. disparis* erst nach dem Tod der Wirtsraupen verbreitet, wodurch es auch sinnvoll für die Mikrosporidien erscheint, dass die Raupen im Larvalstadium verbleiben. Damit kann das Pathogen eine höhere Sporenanzahl bilden und sichert sich somit seine Verbreitung.

Nach Down et al. (2008) kann es bei Mikrosporidien folgende Gründe für einen höheren JH-Titer im Wirt geben: (1.) Die Peptidsignale vom Gehirn zu den Corpora allata (Allatostatin und Allotropin) könnten durch eine Infektion indirekt verändert werden. (2.) Die JH-Biosynthese in den Wirten könnte durch die Mikrosporidien erhöht werden, z. B. durch die

Erhöhung der Aktivität der Corpora allata. (3.) Es kann die Aktivität der JH-Esterase unter Umständen reduziert werden, was dazu führt, dass in infizierten Larven weniger JH abgebaut wird.

Versuche haben ergeben, dass z. B. das Neuropeptid Allotropin in *Manduca sexta* und in *Heliothis virescens* die JH-Biosynthese von Larven und adulten Tieren hemmt (Edwards et al., 2001). Bei einer Parasitierung durch die Eulophide *E. pennicornis* in *L. oleracea* konnte eine erhöhte JH-Biosynthese durch eine Hypertrophie der Corpora allata beobachtet werden (Edwards et al., 2006). Eine direkte Manipulation der Corpora allata ist unwahrscheinlich, da *V. necatrix* wie *V. disparis* hauptsächlich den Fettkörper befällt (Vavra et al., 2006) und dessen Gewebe hypertrophiert wird, was jedoch eine geringere Aktivität des Gewebes zur Folge hat. Allerdings liegen bei mit *V. disparis* infizierten Wirten noch keine detaillierten, histologischen Untersuchungen zum Befall der Nerven, Ganglien und/oder der Corpora allata vor. In Nativpräparaten wurden Primärsporen von *V. disparis* im Nervengewebe nachgewiesen, jedoch niemals eine Weiterentwicklung und Produktion von Dauersporen (Hoch, 1999). Nachfolgend zu den durchgeführten Versuchen wäre es interessant, die Corpora allata der infizierten Raupen mittels histologischer Untersuchungen auf Auswirkungen einer *V. disparis*-Infektion zu untersuchen. So könnte eine aktive Beeinflussung des JH-Titers der Raupen durch Befall der Corpora allata ausgeschlossen werden und die in dieser Arbeit aufgestellte Theorie der passiven Beeinflussung der Wirtstiere bestätigt werden.

Die Vermutung einer Reduktion der Aktivität der JH-Esterase durch die Mikrosporidien (Down et al., 2008) konnte durch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche für *V. disparis* in *L. dispar* nun bestätigt werden.

Die Anwesenheit von JH in Insektenlarven hält bei *L. oleracea* die Metamorphose zwar auf, Down et al. (2008) vermuten allerdings, dass der erhöhte JH-Titer keine direkte Konsequenz der Mikrosporidieninfektion ist. Eine Zerstörung der Kutikula und Enzyme, die für die Häutung wichtig sind, könnten nach deren Schlussfolgerung zur Erhöhung des JH-Gehalts führen. Linde (persönl. Mitteilung) konnte in unveröffentlichten Untersuchungen keinen höheren JH-Titer bei von *Vairimorpha* sp. infizierten *Plutella xylostella* und *Galleria mellonella* nachweisen. Er schloss daraus, dass Mikrosporidien keinen direkten Einfluss auf den JH-Titer ihrer Wirte haben. Die verlängerte Entwicklung könnte aus dem

Nährstoffentzug durch *Vairimorpha* und einem schwachen Zustand der Wirtstiere durch die Zerstörung des Larvalgewebes (besonders des Fettkörpers) resultieren, wodurch der Häutungsprozess hinausgezögert wird, da die Larven nicht genügend Energiereserven für die Häutung haben (Linde, persönl. Mitteilung). Es könnte also sein, dass die verlängerte Entwicklungszeit einfach eine Folge aus einem geschwächten Zustand des Wirtes ist, da diesem Nährstoffe durch die Mikrosporidieninfektion verloren gehen (Hoch et al., 2002; Down et al., 2008).

Parasitoide bzw. Pathogene sind von der Beschaffenheit ihres Wirtes und der Nährstoffversorgung durch diesen abhängig, die intrazellulär-parasitischen Mikrosporidien sind dabei völlig auf die Ressourcen ihres Wirtes angewiesen. Bereits 4 dpi sind in *L. dispar* Larven, die mit *V. disparis* infiziert sind, signifikante Veränderungen im Kohlenhydrat- (Trehalose), Aminosäure- und Fettsäuregehalt der Wirtstiere nachweisbar (Hoch et al., 2002). *V. disparis* stellt damit einen sehr hohen Energieanspruch an seinen Wirt. *G. liparidis* entwickelt sich nachweislich schlechter in Schwammspinnerraupen, die mit Mikrosporidien infiziert sind, da diese ihrem Parasiten weniger Nährstoffe liefern können (Hoch et al., 2002). Die Veränderungen der Nährstoffzusammensetzung der Hämolymphe der infizierten Schwammspinnerraupen können damit durchaus eine Erklärung für die physiologische Beeinträchtigung der Raupen sein.

Hauptinfektionsort einer *V.d.*-Infektion ist der Fettkörper, zentraler Speicherort für Nährstoffe und Energiereserven in Insekten. Vor allem bei holometabolen Insekten nimmt er eine essentielle Rolle in der Entwicklung ein, da in den Larvalstadien zumindest so viel Energie gespeichert werden muss, um Hungerperioden und die Weiterentwicklung zum adulten Tier überdauern zu können (Arrese und Soulages, 2010). Kommt es durch eine Infektion zu einer so schweren Beeinträchtigung des Fettkörpers, dass dieser seine Funktionen nicht mehr wahrnehmen kann und z. B. Enzyme wie die JH-Esterase in ihrer Aktivität beeinträchtigt werden, könnte das unter anderem in einer Erhöhung des JH-Titers der Raupen resultieren. Indirekt würde also die Weiterentwicklung der Larven durch die Pathogene aufgehalten. Eine vollständige Infektion des Fettkörpers mit Mikrosporidien wurde in allen infizierten Versuchsruppen ab 10 dpi beobachtet. Es kann also davon ausgegangen werden, dass der Fettkörper zumindest einen Teil seiner Funktionen verliert, nach den vorliegenden Ergebnissen eben z. B. die Aktivität des Hämolymphenzyms JH-

Esterase. Dadurch wird der Abbau des JH gestört und bei den infizierten Versuchslarven konnten mit fortschreitender Infektion höhere JH-Titer gefunden werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, insbesondere der erstmalige Nachweis einer verringerten JH-Esterase-Aktivität, lassen vermuten, dass eine direkte Beeinflussung der Endokrinologie der Wirtstiere durch Mikrosporidien unwahrscheinlich ist. Viel wahrscheinlicher scheint, dass das aggressive Mikrosporidium durch die hohen Energieansprüche an seinen Wirt eine hungerähnliche Situation im Tier auslöst und weiters den Fettkörper des Wirtes beschädigt. Dadurch verliert dieser anscheinend auch einen Teil seiner Funktionen im endokrinen System, sodass die Aktivität der JH-Esterase in der Hämolymphe erheblich verringert ist und das Juvenilhormon nicht mehr abgebaut wird.

Dies führt zu einer Entwicklungsverzögerung der Raupe, welche der Mikrosporidie ermöglicht, eine höhere Anzahl an Sporen zur Weiterverbreitung zu produzieren.

## 5. Literatur

- Anderson, R.M., May, R.M. 1981. The Population dynamics of microparasites and their invertebrate host. *Philos. Trans. Roy. Soc. London* 291: 451-524.
- Anspaugh, D.D., Roe, R.M., 2005. Regulation of JH epoxide hydrolase versus JH esterase activity in the cabbage looper, *Trichoplusia ni*, by juvenile hormones and xenobiotics. *Journal of Insect Physiology* 51: 523-535.
- Arrese, E.L., Soulages, J.L. 2010. Insect Fat Body: Energy, Metabolism, and Regulation. *Ann. Rev. Entomol.* 55: 207-225.
- Baker, F.C. 1990. Techniques for Identification and Quantification of Juvenile Hormones and Related Compounds in Arthropods. In: Gupta, A.P.: *Morphogenetic Hormones of Arthropods Band 1* Rutgers University Press. New Brunswick, London. 391-439.
- Barbosa, P. 1978. Host plant exploitation by the Gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Ent. Exp. & appl.* 24: 28-37.
- Beckage, N., Riddiford, L. 1982. Effects of parasitism by *Apanteles congregatus* on the endocrine physiology of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *General Compendium of Endocrinology* 47: 337-345.
- Beckage, N.E. 1997. New Insights: How Parasites and Pathogens alter the Endocrine Physiology and Development of Insect Hosts. In: Beckage, N.E.: *Parasites and Pathogens: effects on host hormones and behaviour*. Chapman and Hall. New York. 3-37.
- Beddington, J.R., Free, C.A., Lawton, J.H. 1978. Characteristics of successful natural enemies in models of biological control of insect pests. *Nature* 15: 513-519.
- Bell, R.A., Owens, C.D., Shapiro, M., Tardiff J.R., 1981. Development of mass rearing technology. In: Doane, C.C., McManus, M.L., *The Gypsy moth: Research towards Integrated Pest Management* USDA Technical Bulletin 1584: 599-633.
- Bogenschütz, H., Schröter, H. 1993. Bericht über die Schwammspinner-Situation 1993 in Baden Württemberg. In: Wulf, A., Berendes, K.H.: *Mitteilungen aus der biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft*. 24-34.
- Burri, L., Williams, B.A.P., Bursac, D., Lithgow, T., Keeling, P.J. 2006. Microsporidian mitosomes retain elements of the general mitochondrial targeting system. *PNAS* 103: 15916-15920.
- Campbell, R.W. 1981. Population Dynamics. In: Doane, C.C., McManus, M.L. *The Gypsy Moth: Research Toward Integrated Pest Management*. U.S. Washington D.C.: Department of Agriculture. 65-214.
- Chen, Y., Evans, J.D., Smith, I.B., Pettis, J.S. 2008. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 186-188.
- Cole, T.J., Beckage, N.E., Tan, F.F., Srinivasan, A., Ramaswamy, S.B. 2002. Parasitoid-host endocrine relations: self reliance or co-optation? *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 1673-1679.
- Corradi, N., Keeling, P.J. 2009. Microsporidia: a journey through radical taxonomical revisions. *Fungal Biology Reviews* 23: 1-8.
- Dahm, K.H., Bhaskaran, G., Peter, M.G., Shirk, P.D., Seshan, K.R., Röller, H. 1976: On the identity of the juvenile hormone in Insects. In: Gilbert, L.I.: *The Juvenile Hormones*. Plenum Press. New York, London. 19-47.

- Davidowith, G., Nijhout, F. 2004. The physiological Basis of reaction norms: The interaction among Growth Rate, the duration of growth and body size. *Integr. Comp. Biol.* 44: 443-449.
- DeKort, C.A.D., Granger, N.A. 1981. Regulation of the juvenile hormone titer. *Ann. Rev. Entomol.* 26: 1-28.
- Dettner, K. 1999. Insekten und Mikroorganismen. In: Dettner, K., Peters, W.: *Lehrbuch der Entomologie*. Gustav Fischer. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm. 625-638.
- Doane, C.C. 1970. Primary pathogens and their role in the development of an epizootic in the gypsy moth. *Journal of Invertebrate Pathology* 15: 21-33.
- Doane, C.C., McManus, M.L. 1981. *The gypsy moth: Research toward Integrated Pest Management*. Washington, DC: U.S: Department of Agriculture, Forest Service, Science and Education Agency, Animal and Plant Health Inspection Service, 757 p.
- Down, R.E., Bell, H.A., Bryning, G., Kirkbride-Smith, A.E., Edwards, J.P., Weaver, R.J. 2008. Infection by the microsporidium *Vairimorpha necatrix* (Microsporidia: Microsporidia) elevates juvenile hormone titers in larvae of the tomato moth, *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Invertebrate Pathology* 97: 223-229.
- Dushay, M.S., Beckage, N.E. 1993. Dose-dependent separation of *Cotesia* congregata-associated polydnavirus effects on *Manduca sexta* larval development and immunity. *Journal of Insect Physiology*. 39: 1029-1040.
- Edwards, J.P., Bell, H.A., Audsley, N., Marris, G.C., Kirkbride-Smith, A., Bryning, G., Frisco, C., Cusson, M. 2006. The ectoparasitic wasp *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera: Eulophidae) uses instar-specific endocrine disruption strategies to suppress the development of its host *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Insect Physiology* 52: 1153-1162.
- Edwards, J.P., Corbitt, T.S., McArdle, H.F., Short, J.E., Weaver, R.J. 1995. Endogenous Levels of Insect Juvenile Hormones in Larval, Pupal and Adult Stages of the Tomato Moth, *Lacanobia oleracea*. *Journal of Insect Physiology* 8: 641-651.
- Edwards, J.P., Weaver, R.J., Marris, G.C. 2001. Endocrine changes in lepidopteran larvae: potential challenges to parasitoid development and survival. In: Edwards, J.P., Weaver, R.J.: *Endocrine Interactions of Insect Parasites and Pathogens*. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, 1-31.
- Eggert, A.K., Müller, J.K., Zissler, D. 1999. Fortpflanzung und Entwicklung. In: Dettner, K., Peters, W.: *Lehrbuch der Entomologie*. Gustav Fischer. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm. 364-467.
- Encyclopedia (2002): Biological Pest Control. <http://www.encyclopedia.com/doc/1G2-3400500041.html> / (22.02.2011).
- Eizaguirre, M., Schafellner, C., López, C., Sehna, F. 2005. Relationship between the increase of juvenile hormone titer in early instars and the induction of diapause in fully grown larvae of *Sesamia nonagrioides*. *Journal of Insect Physiology* 51: 1127-1134.
- Fisher, F.M., Sanborn, R.C. 1962. Production of Insect Juvenile Hormone by the Microsporidian Parasite *Nosema*. *Nature* 194: 1193.
- Forbush, E.H., Fernald, C.H. 1896. *The Gypsy Moth. Porthetria dispar* (Linn.) A Report of the Work of destroying the Insects in the commonwealth of Massachusetts, together with an account of its History and Habits both in Massachusetts and Europe. Wright & Potter Printing Co. Boston. 495 p.
- Franzen, C. 2008: Microsporidia: A Review of 150 Years of Research. *The Open Parasitology Journal* 2: 1-34.
- Gilbert, L.L. 1976. *The Juvenile Hormones*. Plenum Press, New York, 572 p.
- Goertz, D., Hoch, G. 2008. (a) 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. 2008. (b) Vertical transmission and overwintering of microsporidia in the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Journal of Invertebrate Pathology* 99: 43-48.
- Goodman, W.G. 1990. Biosynthesis, Titer Regulation, and Transport of Juvenile Hormones. In: Gupta, A.P.: *Morphogenetic Hormones of Arthropods Band 1* Rutgers University Press. New Brunswick, London. 85-115.
- Gupta, A.P. 1990. Morphogenetic Hormones and their glands in Arthropods: Evolutionary Aspects. In: Gupta, A.P.: *Morphogenetic Hormones of Arthropods Band 1* Rutgers University Press. New Brunswick, London. 3-27.
- Hajek, A. 1999. Pathology and Epizootiology of *Entomophaga maimaiga* Infections in Forest Lepidoptera. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 814-835.
- Hammock, B.D., Roe, R.M. 1985. Analysis of Juvenile Hormone Esterase Activity. *Methods in Enzymology* 111: 487-193.
- Hammock, B.D., Sparks, T.C. 1977. A Rapid Assay for Insect Juvenile Hormone Esterase Activity. *Analytical Biochemistry* 82: 573-579.
- Hayakawa, Y. 1990. Juvenile Hormone Esterase Activity Repressive Factor in the Plasma of Parasitized Insect Larvae. *The Journal of Biological Chemistry* 19: 10813-10816.
- Hayakawa, Y. 1995. Growth-blocking peptide: an insect biogenic peptide that prevents the onset of metamorphosis. *Journal of Insect Physiology* 40: 1-6.
- Henrick, C.A., Staal, G.B., Siddall, J.B., 1976. Structure activity relationships in some juvenile hormone analogs. In: Gilbert, L.I.: *The Juvenile Hormones*, Plenum Press, New York. 48-60.
- Hoch, G. 1995. Der Antagonistenkomplex des Schwammspinners *Lymantria dispar* in Populationen mit hoher, mittlerer und niedriger Dichte. Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz. BoKu Wien. 59 p.
- Hoch, G., Schafellner, C., Henn, M.W., Schopf, A. 2002. Alternations in Carbohydrate and Fatty Acid Levels of *Lymantria dispar* Larvae Caused by a Microsporidian Infection and Potential Adverse Effects on a Co-Occuring Endoparasitoid, *Glyptapanteles liparidis*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 50: 109-120.
- Hoch, G. 1999. Wechselwirkungen zwischen einer entomopathogenen Mikrosporidie und dem Endoparasitoiden *Glyptapanteles liparidis* in ihrem gemeinsamen Wirt, der *Lymantria dispar* Larve. Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz. BoKu Wien. 64 p.
- Hoch, G. 2008. Ecological and physiological interactions between entomopathogenic microsporidia and their host insect, *Lymantria dispar* (Lep.: Lymantriidae). Universität für Bodenkultur Wien, Habilitation thesis. 38 p.
- Hoch, G., Schopf, A. 2001. Effects of *Glyptapanteles liparidis* (Hym: Braconidae) Parasitism, Polydnavirus, and Venom on Development of Microsporidia-Infected and Uninfected *Lymantria dispar* (Lep.: Lymantriidae) Larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 77: 37-43.
- 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. *J. Appl. Ent.* 125: 217-227.
- Jones, D., Jones, G., Wing, K.D., Rudnicka, M., Hammock, B.D. 1982. Juvenile Hormone Esterases of Lepidoptera. *Journal of Comparative Physiology* 148: 1-10.
- Jones, G., Hanzlik, T., Hammock, B.D., Schooley, D.A., Miller, C.A., Tsai, L.W., Baker, F.C. 1990. The juvenile hormone titre during the penultimate and ultimate larval statdia of *Trichoplusia ni*. *J. Insect Physiol.* 36: 77-83.

- Kalbacher, G. 2008. Untersuchungen zum Parasitoidenkomplex des Schwammspinners (*Lymantria dispar*, Lep., Lymantriidae) in seiner Progradations- und Kulminationsphase. Institut für Forstentomologie, Forstpathologie und Forstschutz. BoKu Wien. 41 p.
- Keeling, P.J., Fast, N.M. 2002. Microsporidia: Biology and Evolution of highly reduced intracellular Parasites. *Annu. Rev. Microbiology* 56: 93-116.
- Keeling, P.J., Slamovits, C.H. 2004. Simplicity and Complexity of Microsporidian Genomes. *Eukaryotic Cell* 3: 1363-1369.
- Klein, H. 1994. Der Schwammspinner – Forstschädling oder Bioindikator? Waldpolitik Bund: 1-22.
- Kristensen, N.P. 2003. Handbuch der Zoologie Band IV Arthropoda: Insecta, Teilband 36: Lepidoptera, Moths and Butterflies: Morphology, Physiology and Development. De Gruyter. Berlin. 548 p.
- Kurir, A. 1953. Die Fraßpflanzen des Schwammspinners. *Zeitschrift für Angewandte Entomologie*. 34: 543-586.
- Langenbruch, G.A. 1993. Mikrobiologische Bekämpfung frei fressender Schmetterlingsraupen im Forst (insbesondere *Lymantria dispar* und *Lymantria monacha*). In: Wulf, A., Berendes, K.H.: Mitteilungen aus der biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft. 94-108.
- Lee, S.C., Corradi, N., Byrnes, E.J., Torres-Martinez, S., Dietrich, F.A., Keeling, P.J., Heitman, J. 2008. Microsporidia evolved from Ancestral Sexual Fungi. *Current Biology* 18: 1675-1679.
- Leonard, D.E. 1981. Bioecology of the Gypsy Moth. In: Doane, C.C., McManus, M.L. The Gypsy Moth: Research Toward Integrated Pest Management. U.S. Washington D.C.: Department of Agriculture, 9-29.
- Linde, A. 1993. Können Mikrosporidien (Protozoa) zur Populationsregulation des Schwammspinners (*Lymantria dispar* L.) beitragen? In: Wulf, A., Berendes, K.H.: Mitteilungen aus der biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft. 125-129.
- 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. Gen. Techn. Rep. NE-247. USDA Forest Service, Radnor, Pennsylvania. 198-205.
- Martín-Hernández, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A.M., Garrido-Bailón, E., Higes, M. 2007: Outcome of Colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 6331-6338.
- McManus, M.L., Solter, L. 2003: Microsporidian Pathogens in European Gypsy Moth Populations. Proceedings: Ecology, Survey and Management of Forest Insects In: McManus, Michael L.; Liebhold, Andrew M., eds. Proceedings: Ecology, Survey and Management of Forest Insects; 2002 September 1-5; Krakow, Poland. Gen. Tech. Rep. NE-311. Newtown Square, PA: U.S. Dept. of Agriculture, Forest Service, Northeastern Research Station. 44-51.
- Minakuchi, C., Riddiford, L.M. 2006: Insect juvenile hormone action as a potential target of pest management. *Journal of Pesticide Science* 31: 77-84.
- Mori, K., Tominaga, M., Takigawa, T., Matsui, M. 1973. A mild Transesterification Method. *Synthesis*. 12: 790-791.
- Nägeli, C. 1857. Über die neue Krankheit der Seidenraupe und verwandte Organismen. *Bot. Zeitung* 15:760-761.
- Nation, J.L 2008. *Insect Physiology and Biochemistry* - 2nd Edition. CRC Press. Gainesville Florida. 120-153.

- Nierhaus-Wunderwald, D., Wermelinger, B. 2001. Der Schwammspinner (*Lymantria dispar* L.) Merkblatt für die Praxis WSL 34: 1-8.
- Nowock, J., Hammock, B., Gilbert, L.I. 1976. The binding protein as a modulator of juvenile hormone stability and uptake. In: Gilbert, L.I.: The Juvenile Hormones. Plenum Press. New York, London. 354-373.
- Nussbaumer, C. 1998. Biology of Solitary Braconid *Glyptapanteles porthetriae* (Hym. Braconidae) and its Influence on the Juvenile Hormone Metabolism of its Host *Lymantria dispar* (Lep., Lymantriidae). Universität für Bodenkultur Wien. 123 p.
- Ochieng-Odera, J.P.R., Mzingirwa, A.M., Njoroge, P.E.W., Bungu, M.D.O., Munyinyi, D.M., Onyango, F.O. 1994. Larval critical weight, pupation and adult fecundity in the spotted stem borer, *Chilo partellus* Swinhoe (Lepidoptera: Pyralidae): an index of quality. Insect Sci. Appl. 15: 123-127.
- Reardon, R.C. 1981. Parasites. In: Doane, C.C., McManus, M.L. The Gypsy Moth: Research Toward Integrated Pest Management. U.S. Washington D.C.: Department of Agriculture, 299-421.
- Rembold, H. 1990. Roles of Morphogenetic Hormones in Caste Polymorphism in Sting Bees. In: Gupta, A.P.: Morphogenetic Hormones of Arthropods Band 1 Rutgers University Press. New Brunswick, London. 326-343.
- Rembold, H., Lackner, B. 1984. Convenient method for the determination of picomole amounts of juvenile hormone. Journal of Chromatography 323: 355-361.
- Roe, M.R., Venkatesh, K. 1990. Metabolism of Juvenile Hormones: Degradation and Titer Regulation. In: Gupta, A.P.: Morphogenetic Hormones of Arthropods Band 1 Rutgers University Press. New Brunswick, London. 127-167.
- Schafellner, C., Marktl, R.C., Nussbaumer, C., Schopf, A. 2004: Parasitism-induced effects of *Glyptapanteles liparidis* (Hym., Braconidae) on the juvenile hormone titer of its host, *Lymantria dispar*: the role of the parasitoid larvae. Journal of Insect Physiology 50: 1181-1189.
- Schafellner, C., Marktl, R.C., Schopf, A. 2007. Inhibition of juvenile hormone esterase activity in *Lymantria dispar* (Lepidoptera, Lymantriidae) larvae parasitized by *Glyptapanteles liparidis* (Hymenoptera, Braconidae). Journal of Insect Physiology 53: 858-868.
- Schneiderman, H.A., Gilbert, L.I., Weinstein, M.J. 1960. Juvenile Hormone Activity in Micro-Organisms and Plants. Nature 188: 1041-1042.
- Schwerdtfeger, F. 1970. Waldkrankheiten . Ein Lehrbuch der Forstpathologie und des Forstschutzes. Paul Parey. Hamburg / Berlin. 509 p.
- Scott, M.P. 2006: Resource defence and juvenile hormone: The “challenge hypothesis” extended to insects. Hormones and Behaviour 49: 276-281.
- Sparks, T.C., Hammock, B.D., Riddiford, L.M. 1983. The haemolymph juvenile hormone esterase of *Manduca sexta* (L.) – Inhibition and Regulation. Insect Biochem. 13: 529-541.
- Spindler, K.D. 1999. Endokrinologie. In: Dettner, K., Peters, W.: Lehrbuch der Entomologie. Gustav Fischer. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm. 349-361.
- Tillinger, N.A.; Hoch, G., Schopf, A. 2004. Effects of parasitoid associated factors of the endoparasitoid *Glyptapanteles liparidis* (Hymenoptera: Braconidae). Eur. J. Entomol. 101: 243-249.
- Undeen, A. H., Vander Meer, R.K. 1999. Microsporidian Intrasporal Sugars and Their Role in Germination. Journal of Invertebrate Pathology 73: 294-302.
- Vavra, J., Hylis, M., Vossbrinck, C.R., Pilarska, D.K., Linde, A., Weiser, J., McManus, M.L., Hoch, G., Solter, L.F. 2006. *Vairimorpha disparis* n. comb. (Microsporidia: Burenellidae): A Redescription and

- Taxonomic Revision of *Thelophania disparis* Timofejeva 1956, a Microsporidian Parasite of the Gypsy Moth *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: *Lymantriidae*). *Journal of eukaryot. Microbiology* 53: 292-304.
- Venkatesch, K., Roe, R.M. 1989. The regulation of the first peak of haemolymph juvenile hormone esterase activity during the last stadium of the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Journal of Insect Physiology* 35: 543-551.
- Webb., B. A., Rana, R.L., Dahlman, D.L. 2001. Endoparasitoid-mediated disruption of host endocrine systems: common themes through uncommon means. In: Edwards, J.P., Weaver, R.J.: *Endocrine Interactions of Insect Parasites and Pathogens*. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford, 83-92.
- Wegensteiner, R. 2003. Bedeutung von Pathogenen bei Forstinsekten. *Entomologica Austriaca* 8:13-15.
- Wellenstein, G., Schwenke, W. 1978. *Lymantria dispar* L., Schwammspinner. In; Schwenke, W. *Die Forstschädlinge Europas* Bd 1-4. P. Parey, Hamburg / Berlin. Pp. 335-349
- Weseloh, R. 2003. A computer model of the gypsy moth and its fungal pathogen. *Bulletin* 987 (2003): 1-6.
- Williams, B.A.P. 2009. Unique physiology of host-parasite interactions in microsporidia infections. *Cellular Microbiology* 11: 1551-1560.
- Williams, B.A.P; Hirt, R.P., Lucocq, J. M., Embley, T.M. 2002. A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature* 418: 865-869.
- Williams, C.M. 1976. Juvenile Hormone – in retrospect and in prospect. In: In: Gilbert, L.I.: *The Juvenile Hormones*. Plenum Press. New York, London. 1-15.
- Wroblewski, V.J., Harshman, L.G., Hanzlik, T. N. Hammock, B.D. 1990. Regulation of juvenile hormone esterase gene expression in the tobacco budworm (*Heliothis virescens*). *Archives of Biochemistry and Biophysics* 279: 461-466.
- Zurflueh, R.C. 1976. Phenylethers as Insect Growth Regulators: Laboratory and Field Experiments. In: Gilbert, L.I.: *The Juvenile Hormones*. Plenum Press. New York, London. 61-74.
- Zwölfer, H. 1999. Regulation von Populationsdichte. In: Dettner, K., Peters, W.: *Lehrbuch der Entomologie*. Gustav Fischer. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm. 709-729.