

2. Material und Methoden

2.1. Das Insekt

Für die Versuche wurden *Lymantria dispar* Larven des New Jersey Standard Strain (NJSS) aus Gelegen gezogen, die das USDA/APHIS Otis Method Development Center, Cape Cod, Massachusetts, USA zur Verfügung stellte. Die Larven wurden in Gefäßen unterschiedlicher Größe bei einer Temperatur von $24 \pm 1^\circ\text{C}$ (tagsüber) und $18 \pm 1^\circ\text{C}$ (nachts) sowie einer Photoperiode von 16 L : 8 D gehalten. Als Nahrung wurde eine Kunstdiät nach BELL et al. (1981) verwendet, die nach jeweils fünf bis sieben Tagen erneuert wurde.

2.2. Das Pathogen

Im Jahr 1999 wurden im Rahmen einer Aufsammlung von *L. dispar* Larven in der Nähe von Schweinfurt (Bayern) aus den Spinndrüsen einer Larve Mikrosporidien isoliert. Eine vorläufige Charakterisierung (siehe auch 1.2.2.) erlaubt die Einordnung in die Gattung *Nosema* (pers. Mitt. LINDE). Das Isolat wurde als „*Nosema* sp. [Schweinfurt]“ mit der Accession No. (1999-A) in der Sammlung des Illinois Natural History Survey (INHS) und an der Fachhochschule Eberswalde katalogisiert.

In regelmäßigen Abständen wurde eine Passage und Vermehrung von *Nosema* sp. in *L. dispar* durchgeführt. Die Infektion der Larven erfolgte wie weiter unten beschrieben. Die *L. dispar* Larven wurden als späte L₅ oder frühe L₆ seziiert und die Spinndrüsen herauspräpariert. Letztere wurden in Ringerlösung homogenisiert und anschließend 2 min bei 7500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abfiltriert, das reinweiße Pellet in Aqua dest. resuspendiert. Die Zentrifugation wurde noch zweimal wiederholt. Die Sporen wurden mit Hilfe einer Thoma-Kammer gezählt und mit bekannter Konzentration in einer 1 : 1 Aqua dest. : Glycerin-Mischung in Flüssigstickstoff bis zur Verwendung in den Versuchen gelagert.

2.3. Infektion von *Lymantria dispar*

Die im Folgenden beschriebene Vorgehensweise zur Infektion von *L. dispar* Larven wurde, wenn nicht anders erwähnt, auf alle Versuche angewandt.

Um ein ausgewogenes Geschlechterverhältnis zu erreichen, wurden *L. dispar* Larven, die als erste innerhalb von 24 h das Stadium L₃ erreicht hatten, ausgesammelt und verworfen, da diese Larven vor allem sich schnell entwickelnde Männchen waren. Am darauf folgenden Tag wurden alle Larven, die sich in den 24 vorangegangenen Stunden zum Stadium L₃ gehäutet hatten,

ausgesammelt. Diese Larven waren somit mit einer Abweichung von ± 12 h gleich weit entwickelt und wurden in den Versuchen verwendet. Nach einer 24stündigen Hungerperiode wurden diese Tiere in 24-Loch-Mikrotiterplatten vereinzelt und erhielten einen ca. 1 mm^3 großen und mit $1 \mu\text{l}$ Sporensuspension inokulierten Diätwürfel. Die Sporenkonzentration betrug – wenn nicht anders erwähnt – $2 \cdot 10^4$ Sporen/ μl . Auf die Diätwürfel der nicht zu infizierenden Larven, z. B. Kontrolllarven, wurde statt der Sporensuspension Wasser gegeben. Für die Versuche wurden nur *L. dispar* verwendet, welche nach Ablauf von 24 Stunden den gesamten Diätwürfel und somit die volle Sporendosis gefressen hatte.

2.4. Wirkung von *Nosema* sp. auf *Lymantria dispar* in Abhängigkeit von der Haltungsdichte

Das Ziel dieser Versuche war es, die Wirkung des Mikrosporidiums *Nosema* sp. auf die Entwicklung und die Vitalität seines Wirtes *Lymantria dispar* zu untersuchen. Von Interesse war dabei auch der Einfluss einer höheren Populationsdichte, wie sie während einer Massenvermehrung auftreten kann, auf die Entwicklung von *L. dispar*.

Infizierte und nicht infizierte *L. dispar* Larven wurden einzeln oder in Kleinpopulationen aufgezogen. Eine Kleinpopulation umfasste zehn Larven, die in einem Haltungsgefäß mit einem Volumen von 250 ml und einer Oberfläche von 200 cm^2 gemeinsam aufwuchsen. *L. dispar* Larven in Einzelhaltung wurden bis ca. 1 g Körpergewicht in Gefäßen mit einem Volumen von 30 ml und einer Oberfläche von 50 cm^2 und bei einem Gewicht > 1 g in Gefäßen mit einem Volumen von 100 ml bzw. einer Oberfläche von 140 cm^2 gehalten.

Mit Beginn der Versuche wurden an jedem 2. Tag die folgenden Parameter ermittelt: Gewicht der Larven, Mortalität, Häutungen oder Missbildungen und einmalig: Tag der Verpuppung, 24 Stunden danach das Puppengewicht sowie abschließend der Zeitpunkt des Falterschlupfes.

Um eine weitgehend individuelle Erfassung der Gewichtsentwicklung auch von Larven, die in Kleinpopulationen aufwuchsen, zu ermöglichen, wurden diese Individuen mit handelsüblicher Korrekturflüssigkeit (TippEx[®]) markiert. Jede Larve erhielt maximal zwei Punkte in der Mitte des Rücken bzw. an den Seiten. Eine Markierung auf dem Rücken in der Nähe der Kopfkapsel oder des Nachschiebers erwies sich schon in früheren Versuchen als entwicklungshemmend oder tödlich für die Larven.

Das Geschlecht der Versuchstiere wurde anhand des Puppengewichtes, welches deutliche Unterschiede zwischen den männlichen und weiblichen Puppen aufwies, oder am adulten Insekt bestimmt. Somit war eine Unterscheidung der Entwicklungsparameter männlicher und weiblicher *L. dispar* und deren getrennte Auswertung möglich.

Am Ende des Versuches, spätestens 50 Tage nach der Infektion, oder nach dem Tod wurden alle Individuen auf eine Infektion mit *Nosema* sp. kontrolliert. Nicht infizierte Tiere, die nicht zur Kontrollgruppe gehörten, wurden von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Um Hinweise auf Unterschiede in der Fraßmenge infizierter oder nicht infizierter *L. dispar* Larven zu erhalten, wurde die Trockenmasse des Kotes ermittelt.

Für die Durchführung dieses Teilexperimentes wurde der Kot von den *L. dispar* Larven in den oben genannten Versuchen verwendet. Der von den Larven während dieser Versuche abgegebene Kot wurde für 24 Stunden luftgetrocknet. Die so aufbereiteten Proben wurden im Trockenschrank bei 80 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, im Exsikkator abgekühlt und auf einer Analysenwaage ausgewogen. Je Versuch und Behandlungsvariante wurde der Kot von jeweils 60 Larven gesammelt. Die Einzelproben der einzeln gehaltenen *L. dispar* wurden zu sechs Sammelproben von je zehn Larven zusammengefasst, um eine mit den Kotproben von Larven aus Kleinpopulationen vergleichbare Stichprobengröße zu erhalten.

2.5. Einfluss von *Nosema* sp. auf die Fertilität von *Lymantria dispar*

Um die Wirkung einer Mikrosporidien-Infektion auf die Fertilität der Schwammspinner zu untersuchen, wurden sowohl gesunde als auch infizierte Falter, welche als L₃ Larven infiziert worden waren, miteinander gepaart. Folgende vier Paarungskombinationen waren möglich:

- sowohl das Männchen als auch das Weibchen waren gesund (--),
- sowohl das Männchen als auch das Weibchen waren infiziert (++) ,
- das Männchen war infiziert und das Weibchen gesund (+-),
- das Männchen war gesund und das Weibchen infiziert (-+).

Jedes Pärchen wurde in einem 250 ml-Haltungsgefäß zusammen gehalten, das ein gefaltetes Blatt Filterpapier als Ei-Ablagesubstrat enthielt. Nach einigen Tagen wurde die Eiablage kontrolliert. Etwa vier bis fünf Wochen nach der Ablage ist eine Trennung zwischen fertilen und sterilen Eiern möglich. Zu diesem Zeitpunkt wurden die schwammartigen Gelege vorsichtig zwischen Papierhandtüchern und Kimwipes[®]-Präzisionstüchern zerrieben bis die bedeckende Haarschicht entfernt war und alle Eier einzeln sichtbar waren. Die Eier wurden dann in einer Petrischale mit kariertem Papier als Untergrund und mit Hilfe eines Zählautomaten ausgezählt. Je Paarungskombination wurde die Anzahl der fertilen und sterilen Eier von 14–21 Gelege ermittelt.

2.6. Einfluss von *Nosema* sp. auf die Natalität von *Lymantria dispar*

Dieses Experiment wurde durchgeführt, um Einflüsse einer *Nosema* sp. Infektion auf den Schlupferfolg der F₁-Generation zu ermitteln, wenn eines oder beide Elternteile infiziert waren. Nach der Eiablage wurden die Gelege für acht Wochen im Brutschrank unter den in Abschnitt 2.1 beschriebenen Haltungsbedingungen gelagert und daran anschließend für drei Monate im Kühlschrank bei 6 °C über einem Wasserbad aufbewahrt, um die notwendige Diapause zu simulieren. Nach dieser Zeit wurden die Gelege in 250 ml-Haltungsgefäßen im Brutschrank zum Schlüpfen gebracht und mit frischer Diät versehen. Nach 14 Tagen wurde der Schlupfvorgang abgebrochen, da mit keinem weiteren Schlupf zu rechnen war. Die geschlüpften Larven wurden abgetötet und ausgezählt. Zur Ermittlung der Anzahl der sterilen und fertilen Eier, aus denen keine Larven geschlüpft waren, wurden diese Gelege, wie im vorhergehenden Abschnitt beschrieben, aufbereitet. Je Paarungsvariante wurden 8–19 Gelege zum Schlupf gebracht und ausgezählt.

2.7. Transmission von *Nosema* sp.

2.7.1. Vertikale Transmission

2.7.1.1. Erfassung der Infektionsrate der F1-Generation

Der nachfolgend beschriebene Versuch wurde durchgeführt, um festzustellen, ob und in welchem Umfang *Nosema* sp. von seinem Wirt *L. dispar* vertikal übertragen wird.

Für die Durchführung dieses Versuches wurden *L. dispar* Larven aus dem oben beschriebenen Versuch (Abschn. 2.6.) verwendet. Je 15 frisch geschlüpfte Larven wurden bis zum Stadium L₃ einzeln aufgezogen, abgetötet, danach seziiert und auf eine Infektion mit *Nosema* sp. kontrolliert. Waren beide Elternteile infiziert, so wurden je 15 Larven aus zehn Gelegen untersucht. War entweder das Weibchen oder das Männchen infiziert, so wurden 15 Larven aus je zwei weiteren Gelegen untersucht.

2.7.1.2. Nachweis von Mikrosporidien in männlichen und weiblichen Gonaden

Mit Hilfe dieses Versuches sollte geklärt werden, ob *Nosema* sp. die Gonaden seiner männlichen oder weiblichen Wirte infiziert und somit eine vertikale Transmission potenziell möglich ist.

Aus fünf männlichen bzw. weiblichen Larven (spätes L₅ bzw. L₆ Stadium) wurden 26 Tage bzw. 33 Tage nach der Infektion sowie aus fünf männlichen bzw. weiblichen Puppen 41 Tage nach

der Infektion die Gonaden herauspräpariert und für mindestens 24 Stunden nach BOUIN fixiert (HEINRICH, 1957). Anschließend wurden diese in 70%igem Alkohol gewaschen, bis sich dieser nicht mehr verfärbte und kein Essiggeruch mehr wahrnehmbar war und dann in aufsteigender Alkoholreihe entwässert. Die Einbettung der Proben erfolgte in HistoResin (Kunsthartz, Fa. Reichert-Jung). Zum Aushärten verblieben die Proben für 24 h in den Einbettungsformen.

Mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica: Modell Jung M2055, C-Messer, Schnittdicke 5 μm , Freiwinkel 0°) wurde jedes Präparat vollständig geschnitten. Jeder 5. Schnitt wurde verwendet. Die auf Objektträger aufgezogenen Schnitte wurden mit der Schnellfärbung nach RICHARDSON (1960) auf einer Heizplatte bei 60° C für ca. 20 s gefärbt. Überschüssige Farbe wurde mit Aqua dest. abgespült. Nach dem Trocknen wurden die Präparate mit einem Mikroskop untersucht und auf das Vorhandensein von vegetativen Entwicklungsstadien sowie primären Sporen oder Dauersporen kontrolliert.

Für die fotografische Dokumentation wurde eine digitale Kamera (Nikon Coolpix 995) mit einem Mikroskopadapter genutzt.

2.7.2. Horizontale Transmission

2.7.2.1. Effektivität der horizontalen Transmission in Abhängigkeit von der Haltungsdichte

Das Ziel des Experimentes war es, die Effektivität der Ausbreitung von *Nosema* sp. in einer Kleinpopulation und deren Abhängigkeit von der Populationsdichte zu untersuchen. Zu diesem Zweck kamen verschieden große Haltungsgefäße zum Einsatz, die unterschiedliche Populationsdichten simulieren sollten. Die folgenden Größen wurden verwendet:

- kleine 250 ml-Haltungsgefäße mit einer Oberfläche von 200 cm^2 , die auch standardmäßig in anderen Versuchen verwendet wurden,
- mittlere 1,6 l-Haltungsgefäße mit einer Oberfläche von 650 cm^2 ,
- große 3,0 l-Haltungsgefäße mit einer Oberfläche von 1570 cm^2 .

Je Kleinpopulation wuchsen zwei infizierte und acht gesunde *L. dispar* Larven ab dem Stadium L₃ bis zur Verpuppung gemeinsam auf. Es wurden insgesamt vier Versuchsserien mit sechs Wiederholungen jeder Haltungsdichte durchgeführt. Am Ende des Versuches wurden alle Tiere präpariert und auf das Vorhandensein von *Nosema* sp. Sporen kontrolliert. Waren am Ende des Versuches weniger als zwei Larven infiziert, wurde diese Wiederholung von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

2.7.2.2. Erfassung der Latenzperiode und des Zeitfensters für eine horizontale Transmission

Um den Zeitpunkt zu erfassen, ab dem *Nosema* sp. von infizierten Larven ausgehend übertragen werden kann und sich gesunde *L. dispar* Larven anstecken können, wurde der folgende Versuchsansatz gewählt.

Je neun infizierte *L. dispar* Larven wurden gemeinsam in 250 ml-Haltungsgefäßen gehalten. Mit Versuchsbeginn (1. p.i.) wurde eine gesunde, gleichaltrige und mit TippEx[®] markierte Larve hinzugesetzt und nach 24 Stunden gegen eine neue gesunde Larve ausgetauscht. Der Austausch der gesunden Larven endete nach Erreichen des Vorpuppenstadiums. Die exponierten Larven wurden nach dem Austausch in Einzelhaltung bis zum Adultschlupf aufgezogen und am Versuchsende bzw. nach deren Tod auf eine Infektion mit *Nosema* sp. kontrolliert.

Durch die Wahl dieser Versuchsanordnung sollte eine zu den anderen Experimenten vergleichbare Haltungsdichte gewährleistet werden. Weiterhin sollte die Wahrscheinlichkeit für eine horizontale Transmission durch die Überzahl von neun infizierten Larven maximiert werden und der 24stündige Wechsel eine zeitliche Auflösung von einem Tag ermöglichen. Insgesamt wurde dieser Versuch zehn Mal wiederholt.

2.7.2.3. Untersuchung der Übertragungswege für eine horizontale Transmission

Nachweis von Sporen in Kot und Seide

Für den Nachweis von Sporen im Kot oder an der Seide wurden 25 Larven des L₃ infiziert und anschließend einzeln gehalten. Die Gefäße (30 ml bzw. 100 ml) aller Larven wurden täglich gewechselt. Jeden Tag wurde die Abgabe von Kot oder Seide kontrolliert. War dies der Fall, so wurde die Seide und ein Kotkrümel mikroskopisch auf *Nosema* sp. Sporen untersucht.

Experimentelle Untersuchung von Kot als Ansteckungsmöglichkeit

In der standardisierten Versuchsanordnung befand sich die Diät auf dem Becherboden, so dass der Kot darauf abgesetzt wurde. Um abzuschätzen, inwiefern der möglicherweise sporenhaltige Kot und die von ihm kontaminierte Diät eine besondere Ansteckungsquelle darstellen, wurde der folgende Versuchsansatz gewählt.

Acht gesunde und zwei infizierte *L. dispar* Larven wurden vom Beginn des Stadiums L₃ bis zur Verpuppung in 250 ml-Haltungsgefäßen aufgezogen. In der 1. Variante (A) befand sich die Diät wie üblich auf dem Boden des Haltungsgefäßes, so dass der Kot auf die Diät fiel und eine Kontamination dieser mit Sporen aus dem Kot möglich wurde. In einer 2. Variante (B) wurde

das Haltungsgefäß umgedreht, die Diät befand sich nun an der Decke des Gefäßes. Der Kot fiel somit nicht mehr auf die Diät, sondern auf den Deckel. In der 3. Variante (C) befand sich die Diät wiederum an der Gefäßdecke und der Kot fiel jetzt durch ein Gazenetz, das anstelle des Deckels eingesetzt wurde, in ein weiteres Gefäß. Damit stand der Kot als Ansteckungsquelle überhaupt nicht mehr zur Verfügung. Insgesamt wurden vier Versuchsserien mit sechs Wiederholungen jeder Haltungsvariante durchgeführt. Am Ende des Versuches wurden alle Tiere präpariert und auf das Vorhandensein von *Nosema* sp. Sporen kontrolliert. Waren am Ende des Versuches weniger als zwei Larven infiziert, wurden diese Wiederholungen von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

Experimentelle Infektion von Larven über Kot und Seide

Um den Nachweis zu führen, ob und in welchem Umfang sich *L. dispar* Larven über Sporen enthaltenden Kot oder sporenhaltige Seide infizieren lassen, wurde der nachfolgend beschriebene Versuch durchgeführt. Auch sollte die Frage geklärt werden, ob sich die Wahrscheinlichkeiten für eine Infektion über eigene oder fremde Seide und demzufolge auch eigenen und fremden Kot unterscheiden.

Vom Beginn des Stadiums L₃ bis zur Verpuppung wurden täglich 20 nicht infizierte Larven ausgewählt und einzeln in 30 ml-Haltungsgefäße mit frischer Diät gesetzt (Abb. 1). Am nächsten Tag wurde der Kot bzw. die Seide von jeweils zehn Larven mit 1 µl Sporensuspension beimpft. Die Sporenkonzentration betrug $1 \cdot 10^3$ Sporen/µl. Jeweils fünf Larven, deren Kotkrümel mit *Nosema* sp. Sporen inokuliert waren, wurden in dieselben Haltungsgefäße zurückgesetzt. Je fünf Larven wurden in das Haltungsgefäß einer anderen Larve umgesetzt. Mit den Larven, deren Seide kontaminiert wurde, wurde in derselben Weise verfahren. Nach 24 Stunden wurden die exponierten Larven in neue Haltungsgefäße mit frischer Diät gesetzt, bis zum Tod oder Adultschlupf aufgezogen und am Versuchsende bzw. nach deren Tod auf eine Infektion mit *Nosema* sp. kontrolliert.

Durch die Wahl dieser Konzentration und des Suspensionsvolumens sollte die Vergleichbarkeit der beiden Teilerperimente gewährleistet und eine zu hohe Sporenkonzentration auf der Seide vermieden werden. Ebenso wurde der Anteil inokulierter Kotkrümel ermittelt, da die Gesamtzahl abgesetzter Kotkrümel sowohl von Tag zu Tag als auch von Larve zu Larve variierte. Dadurch sollte eine täglich variierende Sporenkonzentration je Larve und eine zu geringe Sporenkonzentration je Kotkrümel vermieden werden. Eine Inokulation jedes abgesetzten Kotkrümels hätte eine täglich und von Larve zu Larve variierende Sporenkonzentrationen zur Folge gehabt.

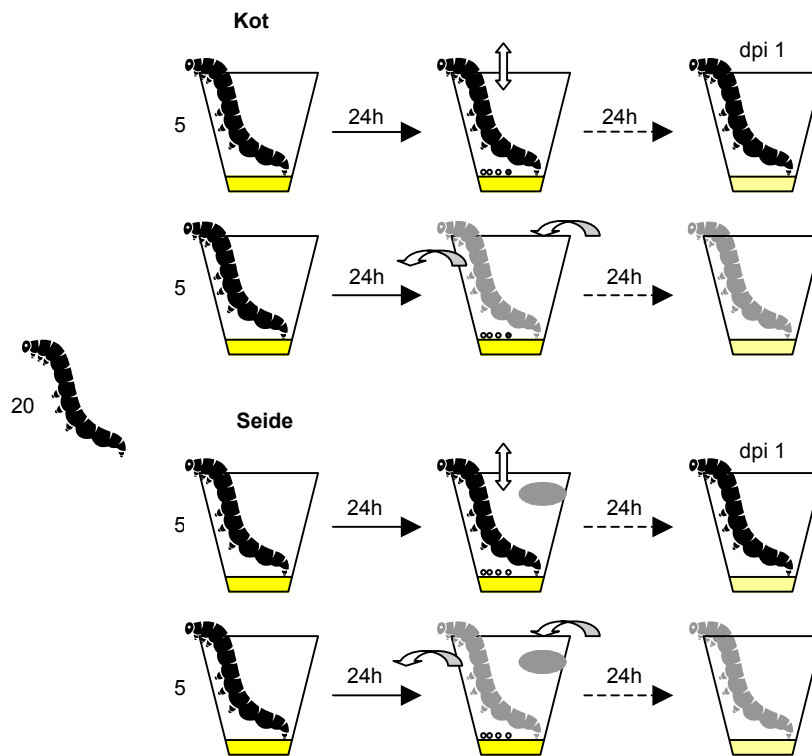


Abb. 1: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung, wenn der Kot oder die Seide – von Testlarven innerhalb von 24 Stunden abgegeben – mit *Nosema*-Sporen kontaminiert wurde
 oben: Kontamination des Kotes, unten: Kontamination der Seide
 ⇕ *L. dispar* Larve wird in das Haltungsgefäß, aus dem sie entnommen wurde, zurückgesetzt
 ↪ *L. dispar* Larve wird in das Haltungsgefäß, aus dem sie entnommen wurde, nicht zurückgesetzt. Eine andere *L. dispar* Larve wird in dieses Gefäß gesetzt.
 → nach 24 h keine neuen Haltungsgefäße mit frischer Diät verwendet
 --▶ nach 24 h neue Haltungsgefäße mit frischer Diät verwendet
 Zahlen vor den Bechern bedeuten Anzahl der verwendeten Larven.

2.8. Wirkung von Dimilin auf eine Mikrosporidien-Infektion

Das Ziel der im Folgenden beschriebenen Experimente war es, die Wirkung einer Dimilinbehandlung auf die Interaktion der Wirt-Parasit-Beziehung *L. dispar* und *Nosema* sp. zu untersuchen. Für die nachfolgend beschriebenen Versuche wurde das Produkt Dimilin WP25[®] genutzt, welches als wirksame Substanz Diflubenzuron mit einem Wirkstoffanteil von 25 % enthält.

2.8.1. Ermittlung der optimalen Dosis für eine Dimilinbehandlung

Bevor mit den Experimenten zu den Wirkungen von Dimilin auf die Wirt-Parasit-Beziehung von *Nosema* sp. und *L. dispar* begonnen werden konnte, musste eine Dimilindosis gefunden werden, die eine längere Überlebenszeit von *L. dispar* gewährleistete, damit die Möglichkeit zur Infektion mit *Nosema* sp. noch gegeben war.

Zu diesem Zweck wurden je 2 ml Dimilinlösung sechs verschiedener Konzentration (Tab. 1) auf die Diät der 250 ml-Haltungsgefäßen versprüht. Die Dimilinkonzentrationen wurden zwischen 100% und <1 %, entsprechend der im Freiland verwendeten Menge, variiert. Larven des L₃ fraßen für 24 Stunden auf dieser Diät und wurden anschließend in unbehandelte 250 ml-Haltungsgefäße umgesetzt und bis zum Tod bzw. Adultschlupf aufgezogen. Je Wirkstoffkonzentration wurden 30 Larven verwendet. Mit Beginn der Versuche wurden an jedem 2. Tag die folgenden Parameter ermittelt: Gewicht der Larven, Mortalität, Häutungen oder Missbildungen und einmalig: Tag der Verpuppung, 24 Stunden danach das Puppengewicht sowie abschließend der Zeitpunkt des Falterschlupfes.

Tab. 1: Dimilinkonzentration und Wirkstoffkonzentration von Diflubenzuron je Quadratzentimeter Diätfläche

Behandlungsansatz	Dimilin / cm ² Diät	Diflubenzuron / cm ² Diät
Kontrolle	0,00 ng	0,00 ng
1	26,00 ng	6,50 ng
2	13,00 ng	3,20 ng
3	6,50 ng	1,60 ng
4	1,30 ng	0,32 ng
5	0,65 ng	0,16 ng
6	0,13 ng	0,03 ng

2.8.2. Wirkung von Dimilin auf die Infektiosität von *Nosema* sp. und die Vitalität von *Lymantria dispar*

Das Ziel des nachfolgend beschriebenen Experimentes war es, zunächst die Wirkung einer Dimilinbehandlung auf die Infektiosität von *Nosema* sp. und die Vitalität seines Wirtes *L. dispar* zu ermitteln. Zu diesem Zweck wurde Dimilin 24 Stunden oder sechs Tage vor bzw. nach einer Infektion mit *Nosema* sp. (Abschn. 2.3) an je 30 *L. dispar* Larven des L₃ verfüttert. Die applizierte Dimilin- bzw. Sporenkonzentration kann Tabelle 2 entnommen werden. Alle Larven hatten 24 Stunden Zeit, mit Dimilin behandelte Diät zu fressen. Nach der Dimilinbehandlung bzw. Infektion wurden alle *L. dispar* Larven einzeln gehalten. Mit Beginn der Versuche wurden an jedem 2. Tag die folgenden Parameter ermittelt: Gewicht der Larven, Mortalität, Häutungen oder Missbildungen und einmalig: Tag der Verpuppung, 24 Stunden danach das Puppengewicht sowie abschließend der Zeitpunkt des Falterschlupfes. Nach dem Tod bzw. dem Versuche – spätestens 50 Tage nach der Infektion – wurden alle Individuen auf eine erfolgreiche Infektion

mit *Nosema* sp. untersucht. Waren keine Sporen nachweisbar, wurden Ausstrichpräparate angefertigt und nach einer GIEMSA-Färbung auf vegetative Stadien von *Nosema* sp. untersucht.

Tab. 2: Applikationsschema für die Behandlung von *L. dispar* Larven mit Dimilin und/oder *Nosema* sp. Dargestellt sind die verschiedenen Versuchsgruppen, die zeitliche Abfolge der Applikation von Dimilin oder Infektion mit *Nosema* sp. sowie die verwendeten Konzentrationen

Gruppe	Behandlung mit		Konzentration
	<i>Nosema</i>	Dimilin	
Kontrolle	-	-	Aqua dest. & Aqua dest.
Infiziert	2. Tag L ₃	-	2 * 10 ⁴ Sp/μl & Aqua dest.
Infiziert & Dimilin 24 h	2. Tag L ₃	3. Tag L ₃	2 * 10 ⁴ Sp/μl & 0,65 ng Dimilin / cm ² Diät
Dimilin & Infiziert 24 h	3. Tag L ₃	2. Tag L ₃	0,65 ng Dimilin / cm ² Diät & 2 * 10 ⁴ Sp/μl
Infiziert & Dimilin 6 d	2. Tag L ₃	7. Tag L ₃	2 * 10 ⁴ Sp/μl & 0,65 ng Dimilin / cm ² Diät
Dimilin & Infiziert 6 d	7. Tag L ₃	2. Tag L ₃	0,65 ng Dimilin / cm ² Diät & 2 * 10 ⁴ Sp/μl
Dimilin	-	2. Tag L ₃	0,65 ng Dimilin / cm ² Diät & Aqua dest.

2.8.3. Sporenproduktion in dimilinbehandelten und unbehandelten Larven

Die Wirkung einer Dimilinbehandlung auf die Intensität einer *Nosema*-Infektion in *L. dispar* sollte mit Hilfe des folgenden Versuchsansatz geklärt werden.

Je 30 Larven erhielten 24 Stunden oder sechs Tage vor oder nach einer Infektion mit *Nosema* sp. Dimilin (Tab. 2). Die Versuchsanordnung und die applizierten Dosen entsprachen dem Vorgehen, wie es im vorangegangenen Abschnitt (siehe 2.8.2.) beschrieben wurde. Zeitgleich erhielten jeweils 30 weitere infizierte Larven mit Wasser statt Dimilin behandelte Diät und bildeten die Vergleichsgruppen. Mit Beginn der Versuche wurden an jedem 2. Tag die folgenden Parameter ermittelt: Gewicht der Larven, Mortalität, Häutungen oder Missbildungen und einmalig: Tag der Verpuppung, 24 Stunden danach das Puppengewicht sowie abschließend der Zeitpunkt des Falterschlupfes. Beim Tod eines Tieres aus der Dimilin- oder der Vergleichsgruppe wurde eine Larve oder Puppe aus der anderen Gruppe getötet. Das Auswahlkriterium für die zu tötende Larve bzw. Puppe war deren gleicher Rang. Die Ränge in jeder Gruppe wurden anhand der Larvengewichte am 1. Tag p.i. gebildet. Mit diesem Vorgehen sollte sichergestellt werden, dass nur Larven miteinander verglichen werden, die sich zu Versuchsbeginn hinsichtlich ihres Gewichtes nicht wesentlich unterschieden.

Nach dem Tod wurden die *L. dispar* individuell im Handhomogenisator in Aqua dest. homogenisiert, das Homogenat durch eine Lage Zellstoff filtriert und gespült bis das Filtrationsvolumen 4,5 ml erreicht hatte. Die Suspension wurde auf drei Eppendorf-Gefäße aufgeteilt und zweimal je 2 min bei 7500 rpm zentrifugiert. Die reinweißen Pellets wurden in

Aqua dest. aufgelöst, in ein Eppendorf-Gefäß zusammengeführt und gemischt. Die Sporenkonzentration dieser Suspension wurde mit Hilfe einer Thoma-Kammer ermittelt. Zur Auswertung der Ergebnisse wurde die durchschnittliche Sporenzahl je Larve und je mg Frischgewicht der Larve ermittelt sowie eine relative Wachstumsrate der Larve nach WALDBAUER (1968) berechnet (Gl. 1). Da Dimilin das Wachstum der *L. dispar* Larven hemmt und bereits dadurch die Vermehrung der Sporen indirekt beeinträchtigte, wurde auf Grund der relativen Wachstumsrate nicht dimilinbehandelter Larven und der Sporenzahl mit Dimilin behandelter Larven ein Erwartungswert (Gl. 2) berechnet. Dieser Erwartungswert sollte es ermöglichen, Schlussfolgerungen über die Wirkung von Dimilin auf die Entwicklung von *Nosema* sp. zu ziehen.

Berechnung der relativen Wachstumsrate (bezogen auf ein Larvenstadium):

$$\text{RGR} = (\text{FG}_2 - \text{FG}_1) / \text{Tage} * \{ 1 / [(\text{FG}_1 + \text{FG}_2) / 2] \} \quad (\text{Gl. 1})$$

RGR	relative Wachstumsrate
FG ₁ ; FG ₂	Frischgewicht der Larve am Beginn und am Ende des Larvenstadiums
Tage	Dauer des Larvenstadiums in Tagen

Berechnung des Erwartungswertes:

$$\text{Sporen}_{\text{erwartet}} = \text{Sporen}_{\text{Dimilin}} * (\text{RGR}_{\text{Nosema}} / \text{RGR}_{\text{Dimilin}}) \quad (\text{Gl. 2})$$

Sporen _{erwartet}	erwartete Sporenzahl
Sporen _{Dimilin}	Sporenzahl Dimilin behandelter Larven
RGR _{Nosema} ; RGR _{Dimilin}	relative Wachstumsrate nur mit <i>Nosema</i> sp. infizierter bzw. mit Dimilin behandelter Larven

2.8.4. Infektiosität von *Nosema* sp. Sporen aus dimilinbehandelten Larven

Das Ziel dieses Versuches bestand darin zu ermitteln, inwiefern Sporen, die in dimilinbehandelten Larven gebildet wurden, eine Mikrosporidieninfektion hervorrufen können. Zu diesen Zweck wurden Sporen aus dimilinbehandelten Larven und unbehandelten Larven gewonnen. Es wurden fünf Sporensuspensionen von jeweils fünf individuell aufbereiteten *L. dispar* verwendet, denen sowohl Dimilin als auch *Nosema* sp. innerhalb von 24 Stunden oder sechs Tagen verfüttert wurde (Tab. 2) und insgesamt fünf Sporensuspensionen von fünf individuell aufbereiteten *L. dispar* Larven, die nur mit *Nosema* sp. infiziert wurden.

Für die Infektion wurden die unterschiedlich konzentrierten Sporensuspension auf eine Konzentration von $2 \cdot 10^4$ Sporen/ μl , wie sie standardmäßig in den anderen Versuchen

Verwendung fand, eingestellt und an je sechs *L. dispar* des Stadiums L₃ verfüttert. Somit wurden je Behandlungsansatz des vorangegangenen Versuches 30 Larven infiziert. Als Kontrolle wurden zusätzlich je 30 Larven mit *Nosema* sp. Sporen aus Flüssigstickstoff infiziert, die entweder für 24 h in einer Dimilinlösung, mit der hier standardmäßig verwendeten Wirkstoffkonzentration von 0,16 ng Diflubenzuron, gelagert und anschließend mehrmals gewaschen wurden oder unbehandelt blieben.

Mit Beginn des Versuches wurden alle *L. dispar* Larven einzeln gehalten. Nach dem Tod oder am Ende des Versuches wurden alle Individuen präpariert und auf eine erfolgreiche Infektion mit *Nosema* sp. kontrolliert.

2.9. Statistische Auswertung der Versuche

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde das Software Programm SPSS11.0 genutzt.

Die Daten wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. War dies der Fall, wurde bei mehr als zwei zu vergleichenden Gruppen eine ANOVA durchgeführt und daran anschließend und in Abhängigkeit von der Homogenität der Varianzen multiple Vergleiche nach LSD bzw. Games-Howell. Der Vergleich zweier Mittelwerte wurde mit Hilfe des t-Testes abgesichert. Nicht normalverteilte Daten mit mehr als zwei Gruppen wurden mit Hilfe des H-Testes analysiert. Für multiple paarweise Vergleiche wurde das Tukey-Kramer-Verfahren genutzt. Waren zwei Gruppen zu vergleichen, wurde der U-Test angewandt. Der Vierfelder- χ^2 -Test diente zur Analyse von Häufigkeiten. Waren mehrfache Vergleiche durchzuführen, wurde α adjustiert. (SACHS, 1997). Für die Analyse verbundener Stichproben wurde der Friedmann-Test genutzt und multiple paarweise Vergleiche nach Wilcoxon & Wilcox durchgeführt.

2.10. Modellierung

2.10.1. Zielstellung

Im Anschluss an die Laboruntersuchungen und mit Hilfe der daraus gewonnenen Erkenntnisse wurde ein Simulationsmodell entwickelt, um die Dynamik der Wirt-Parasit-Beziehung von *Nosema* sp. [Schweinfurt] und *L. dispar* zu untersuchen. Dabei standen zwei Fragen im Mittelpunkt: Erstens sollte geklärt werden, welche Faktoren die Transmission der Mikrosporidien von *L. dispar* Larve zu *L. dispar* Larve in entscheidender Weise beeinflussen. Zweitens sollten die langfristigen Entwicklungen der Population untersucht und wichtige Faktoren, welche die Dynamik der Wirt-Parasit-Beziehung bestimmen, ermittelt werden.

2.10.2. Ableitung der Modellgleichungen

Das von ANDERSON & MAY (1981) entwickelte System von Differentialgleichungen beschreibt die Interaktionen eines Wirt-Parasit-Systems mit einer Latenzperiode und frei lebenden Pathogenen (Gl. 3 bis Gl. 6). Es ist ein kontinuierliches Modell. S beschreibt die Zahl der gesunden, also empfänglichen Wirte in Abhängigkeit von der Zeit. Die Population wächst mit der Reproduktionsrate r , die für infizierte und gesunde Wirte gleich ist, das heißt in diesem Modell ist die Fruchtbarkeit infizierter Wirte nicht reduziert. Gesunde Wirte sterben mit der Rate b oder erkranken mit der Rate v . Infizierte aber noch nicht infektiöse Wirte passieren die Gruppe der Latenten (L) mit der Rate v , das heißt, $1/v$ beschreibt die Länge der Latenzperiode. Nach der Latenzperiode geht der Wirt in die Gruppe der infektiösen Wirte (I) mit der Rate v über und erfährt eine krankheitsbedingte Sterberate α und eine natürliche Mortalitätsrate b . Die Anzahl der frei lebenden Pathogene (P) erhöht sich mit der Produktionsrate der Pathogene λ durch die Wirte und reduziert sich mit der Abbaurate μ und der Konsumtion durch gesunde, latente oder infektiöse Wirte. Eine vertikale Transmission tritt nicht auf.

$$dS / dt = r*(S + I) - b*S - v*P*S \quad (\text{Gl. 3})$$

$$dL / dt = v*P*S - (b + v)*L \quad (\text{Gl. 4})$$

$$dI / dt = v*L - (\alpha + b)*I \quad (\text{Gl. 5})$$

$$dP / dt = \lambda*I - [\mu + (S+L+I)]*P \quad (\text{Gl. 6})$$

Dieses Modell entspricht nicht der Biologie des Insektes *Lymantria dispar*: *L. dispar* ist ein holometaboles Insekt und hat nur eine Generation pro Jahr. Weiterhin tritt eine Infektion mit

Mikrosporidien gewöhnlich dann auf, wenn Dauersporen mit der Nahrung aufgenommen werden. Das einzige für eine Infektion empfängliche Stadium ist daher das Larvenstadium. Somit gibt es eine Trennung der Infektion bzw. horizontalen Transmission von Mikrosporidien und der Reproduktion von *L. dispar* (Abb. 2). Deshalb sind einige Änderungen des oben beschriebenen Modells notwendig, wie sie z. B. von DWYER (2000) durchgeführt wurden und die Entwicklungsstadien Larve, Puppe, Falter sollten in drei verschiedenen Differenzgleichungen modelliert werden.

Während des Larvenstadiums ist die Reproduktionsrate $r = 0$ und jede Generation beginnt mit einem Pool frisch geschlüpfter Larven (S), die sich entwickeln, sterben, infiziert werden, in eine Latenzperiode (L) eintreten oder sich verpuppen (Gl. 7 bis Gl. 9). Die gewöhnliche Dauer des Larvenstadiums ist n . Es wird angenommen, dass sie das Larvenstadium mit a passieren, in Abhängigkeit von ihrer Infektion, und sich verpuppen, wenn $a_s = n_s$ oder $a_i = n_i$. Die natürliche Sterberate der Larven ist b_l , die krankheitsbedingte α_l . Die Transmissionsfunktion (h) und die Berechnung der Latenzperiode (lp) werden weiter unten beschrieben. Es wird angenommen, dass die Konsumtion von Mikrosporidien durch *L. dispar* Larven sehr gering ist im Vergleich zu deren Reproduktion und Freisetzung. Daraus resultieren die folgenden Gleichungen für das Larvenstadium:

$$S(t+1, a+1) = (1 - h) * S(t, a) - b_l * S(t, a) \quad (\text{Gl. 7})$$

$$L(t+1, a+1, d+1) = h * S(t, a) - (b_l + \alpha_l + v) * L(t, a, d) \quad (\text{Gl. 8})$$

$$I(t+1, a+1) = [1 - (b_l + \alpha_l)] * L(t, a, lp) - (b_l + \alpha_l) * I(t, a) \quad (\text{Gl. 9})$$

t	Kalenderzeit in Tagen	1	t	(n + m + 1)
a	Alter der Larve in Tagen	1	a	n
d	Tage in der Latenzperiode (lp)	1	d	lp
S	gesunde Larven			
L	infizierte, jedoch noch nicht infektiöse latente Larve			
I	infizierte und infektiöse Larven			
b_l	natürliche Mortalität der Larven			
α_l	krankheitsbedingte Mortalität der Larven			

Puppen (Pupa) können nicht infiziert werden oder Mikrosporidien an Larven oder Falter derselben Generation übertragen. Sie passieren das Puppenstadium mit c_s oder c_i in Abhängigkeit davon, ob sie infiziert sind oder nicht. Larven, die infiziert aber noch nicht infektiös sind, und infektiöse Larven gehen in dieselben Gruppe der infizierten Puppen ein und durchlaufen dieses Entwicklungsstadium in derselben Zeit.

$$Pupa_s(t+1,1) = (1 - h) * S(t,n) \tag{Gl. 10}$$

$$Pupa_i(t+1,1) = h * S(t,n) + (1 - b_l + \alpha_l) * L(t,n,d) + [1 - (b_l + \alpha_l)] * I(t,n) \tag{Gl. 11}$$

$$Pupa_s(t+1,c+1) = (1 - b_p) * P_s(t,c) \tag{Gl. 12}$$

$$Pupa_i(t+1,c+1) = [1 - (b_p - \alpha_p)] * P_i(t,c) \tag{Gl. 13}$$

c Alter der Puppen in Tagen 1 c m

m Dauer der Puppenruhe

Pupa_i infizierte Puppen

Pupa_s gesunde Puppen

b_p natürliche Mortalität der Puppen

α_p krankheitsbedingte Mortalität der Puppen

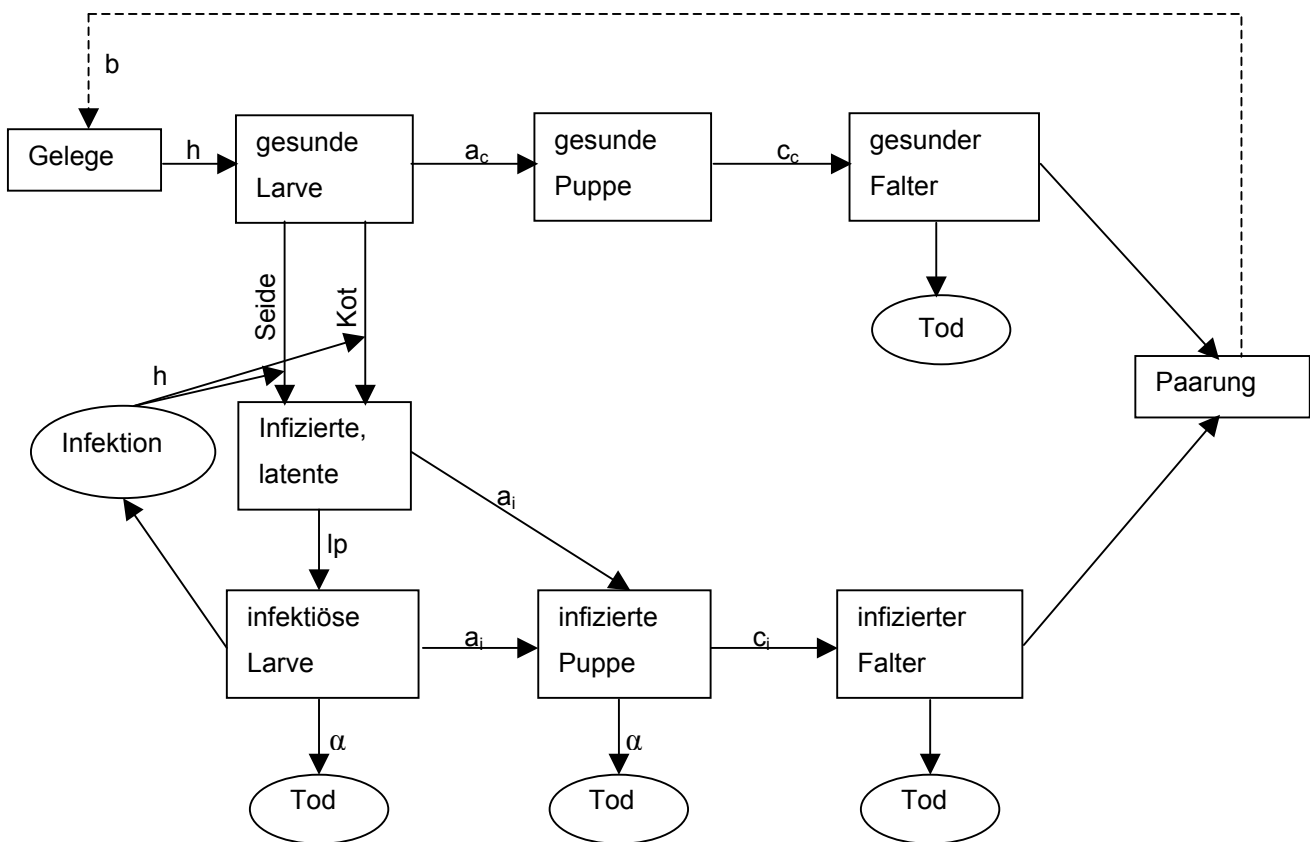


Abb. 2: Schematische Darstellung des Modells und der Annahmen für Erklärungen siehe Text

Die Anzahl der Falter wird zu Beginn jeder Generation auf Null gesetzt, da sie nicht überwintern. Am Ende der Saison wird die Anzahl der Falter in zwei Lagern akkumuliert, welche die infizierten oder die gesunden Falter enthalten. Ihre Anzahl und ihr Verhältnis ist die Basis für die Berechnung der nächsten Generation.

$$F_i = F_s = 0 \quad (\text{Gl. 14})$$

$$F_s = F_s + P_s(m) \quad (\text{Gl. 15})$$

$$F_i = F_i + P_i(m) \quad (\text{Gl. 16})$$

F_s gesunde Falter

F_i infizierte Falter

2.10.2.1. Berechnung der nächsten Generation

Die Zahl der Nachkommen wird in einer separaten Gleichung berechnet, welche die verschiedenen Generationen miteinander verbindet.

In Abhängigkeit von der Infektion der Männchen oder Weibchen legen befruchtete Weibchen Eier (b) ab, von denen der Anteil h – wiederum in Abhängigkeit von einer Mikrosporidieninfektion – überlebt. Weiterhin wird angenommen, dass das Verhältnis von Männchen zu Weibchen stets gleich und unabhängig von der Infektion ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich zum Beispiel ein infiziertes Männchen und ein gesundes Weibchen paaren, hängt von dem Verhältnis infizierter und gesunder Falter ab.

$$\text{eggs} = b_{cc} \cdot h_{cc} \cdot F_{cc} \cdot (p_h \cdot p_h) + b_{ci} \cdot h_{ci} \cdot F_{ci} \cdot (p_h \cdot p_i) + b_{ic} \cdot h_{ic} \cdot F_{ic} \cdot (p_i \cdot p_h) + b_{ii} \cdot h_{ii} \cdot F_{ii} \cdot (p_i \cdot p_i) \quad (\text{Gl. 17})$$

$$F_{\text{total}} = F_i + F_s = 2 \cdot (F_{cc} + F_{ci} + F_{ic} + F_{ii}) \quad (\text{Gl. 18})$$

$$p_h = F_s / (F_i + F_s) \quad (\text{Gl. 19})$$

$$p_i = F_i / (F_i + F_s) \quad (\text{Gl. 20})$$

b	Fruchtbarkeit infizierter oder gesunder Falter	Eier/Weibchen
h	% überlebende Embryonen	geschlüpfte L1/Gelege
F	Anzahl der Weibchen	
cc	gesundes Männchen & gesundes Weibchen	
ci	gesundes Männchen & infiziertes Weibchen	
ic	infiziertes Männchen & gesundes Weibchen	
ii	infiziertes Männchen & infiziertes Weibchen	
p_h	Anteil gesunder Weibchen an der Gesamtpopulation	
p_i	Anteil infizierter Weibchen an der Gesamtpopulation	

2.10.2.2. Transmission

Mit Hilfe des hier dargestellten Modells sollte die Ausbreitung der Mikrosporidien nur über Seide und Kot innerhalb einer Generation analysiert werden. Andere mögliche Ansteckungsquellen oder Infektionsquellen, wie Kadavern infizierter *L. dispar* oder Kontakte mit infizierten Larven wurden ausgeschlossen.

Transmission über Seide

L. dispar Larven produzieren Seide, die im Falle einer Mikrosporidieninfektion Sporen enthalten kann (JEFFORDS, 1988). Werden die Spinndrüsen der Larven befallen, kann die Freisetzung von Seide reduziert sein. Das heißt, die Wahrscheinlichkeit für die Abgabe von Seide durch gesunde, latente bzw. infektiöse Larven kann verschieden sein.

Für die Modellierung wird angenommen: Wenn infektiöse Larven Seide mit Sporen abgeben, ist die darin enthaltene Sporenmenge ausreichend, um eine Mikrosporidien-Infektionen bei empfänglichen Larven hervorzurufen. Weiterhin wird angenommen, dass gesunde oder infektiöse Larven innerhalb von 24h dieselbe Menge Seide abgeben, wenn sie diese abgeben. Daraus folgt, dass die erfolgreiche Übertragung von Mikrosporidien über Seide

- von dem Anteil infektiöser Seide $dsilk_{inf}(t)$ in der Umwelt zu jedem Zeitpunkt t ,
- von der Wahrscheinlichkeit nach dem Kontakt mit kontaminierter Seide (ψ) infiziert zu werden
- und von der Anzahl gesunder Larven (S) abhängt.

$$\text{Ansteckung über Seide} \sim dsilk_{inf}(t) * \psi * S(t) \quad (\text{Gl. 21})$$

Der Anteil infektiöser Seide $dsilk_{inf}(t)$ zu jedem Zeitpunkt t wird berechnet als das Verhältnis von infektiöser Seide ($silk_{inf}(t)$) zur Gesamtmenge der Seide (Summe der nicht infektiösen ($silk_{non}(t)$) und infektiösen Seide).

$$dsilk_{inf}(t) = silk_{inf}(t) / [silk_{inf}(t) + silk_{non}(t)] \quad (\text{Gl. 22})$$

Die infektiöse und die nicht infektiöse Seide wird während einer Generation akkumuliert. Daher ist die Gesamtmenge der Seide (infektiös oder nicht) zu einer gegebenen Zeit t die Summe aus der Gesamtmenge der Seide (infektiös oder nicht) zum Zeitpunkt $(t-1)$ und der Wahrscheinlichkeit der Freisetzung von Seide multipliziert mit der Anzahl der gesunden, latenten oder infektiösen Larven zum Zeitpunkt t .

Die Wahrscheinlichkeit, ob eine Larve Seide abgibt, hängt von ihrem Status als gesunde (ps_{non}), latente (ps_{non}) oder infektiöse (ps_{inf}) ab. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine infektiöse Larve Sporen mit der Seide abgibt, ist pss_{inf} . Daher ist die Akkumulation von Seide:

$$silk_{non}(t) = silk_{non}(t-1) + ps_{non} * S(t) + ps_{non} * L(t) + (1 - pss_{inf}) * ps_{inf} * I(t) \quad (Gl. 23)$$

$$silk_{inf}(t) = silk_{inf}(t-1) + pss_{inf} * ps_{inf} * I(t) \quad (Gl. 24)$$

Transmission über Kot

Larven produzieren in Abhängigkeit von ihrem Alter und ihrer Infektion Kot, der Sporen enthalten kann. Für die Modellierung wurden auf der Grundlage der Experimente zur Kotproduktion Gleichungen für die tägliche Gesamtkotmenge abgeleitet und für die Simulationen verwendet (Tab. 19). Für die Anpassung einer Funktion an die insgesamt abgegebene Kotmenge wurde statt der linearen eine logistische Gleichung gewählt, da sehr kleine Larven (L_1 – L_3) viel geringere Mengen Kot absetzen können als Larven höherer Entwicklungsstadien, die das 500fache bis 1.000fache Gewicht erreicht haben. Gegen Ende der larvalen Entwicklung stellen Larven des 5. bzw. 6. Larvenstadiums ihre Nahrungsaufnahme ein und geben ebenfalls weniger Kot ab, da in Vorbereitung auf die Verpuppung der Darm entleert wird (LEONARD, 1981). Daraus folgt, dass die abzuleitenden Gleichungen am Anfang und am Ende einen flachen Anstieg aufweisen müssen, was dem Verhalten der logistischen Gleichung $y = 1 / [1 / u + (b_0 + b_1 t^i)]$ entspricht. Der Parameter u markiert den Gesamtwert der abgegebenen Kotmenge, die in den einzelnen Versuchen unterschiedlich war. Die Abgabe von Kot durch infizierte und infektiöse Larven bis zur Verpuppung wird z. B. durch die folgende Funktion beschrieben:

$$pf_{inf} = y = 1 / [1/820 + (1.8672 + 0.7019^i)] \quad (R^2 = 0.945)$$

und die nachfolgende Funktion beschreibt die Abgabe von Kot durch gesunde Larven bis zur Verpuppung:

$$pf_{non} = y = 1 / [1/1000 + (1.1532 + 0.7095^i)] \quad (R^2 = 0.961).$$

Die Funktionen pf_{inf} , pf_{non} beschreiben somit die Abgabe von Kot auf einer täglichen und individuellen Basis. pfs_{inf} ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine erkrankte oder infektiöse Larve Kot abgibt, pf_{non} beschreibt dasselbe für eine gesunde Larve. Die erfolgreiche Übertragung von Mikrosporidien durch Kot hängt

- von dem Anteil infektiösen Kotes $dfeces_{inf}(t)$ zu jedem Zeitpunkt t ,
- der Wahrscheinlichkeit nach dem Kontakt mit kontaminiertem Kot (pf_i) infiziert zu werden
- und der Anzahl gesunder Larven ab.

Daraus folgt:

$$\text{Ansteckung über Kot} \sim dfeces_{inf}(t) * pf_i * S(t) \quad (\text{Gl. 25})$$

Der Anteil von infektiösem Kot $dfeces_{inf}(t)$ zu jedem Zeitpunkt t wird berechnet als das Verhältnis von infektiösem Kot ($feces_{inf}(t)$) zum Zeitpunkt t zur Gesamtmenge des Kotes ($feces_{non}(t)$). Während einer Generation akkumuliert sich der Kot und ein Abbau findet nicht statt.

$$dfeces_{inf}(t) = feces_{inf}(t) / [feces_{inf}(t) + feces_{non}(t)] \quad (\text{Gl. 26})$$

Die Gesamtmenge Kot (infektiös oder nicht) zum Zeitpunkt t ist die Gesamtmenge des Kotes zum Zeitpunkt $(t-1)$ und die Menge des Kotes zum Zeitpunkt t multipliziert mit der Anzahl gesunder, erkrankter und infektiöser Larven zum Zeitpunkt t . Die Wahrscheinlichkeit, dass eine infektiöse Larve Sporen enthaltenden Kot abgibt, ist $psf_{inf}(t)$. Daher ist die Akkumulation von Kot:

$$feces_{non}(t) = feces_{non}(t-1) + pf_{non} * S(t) + pf_{inf} * L(t) + pf_{inf} * I(t) * [1 - psf_{inf}(t)] \quad (\text{Gl. 27})$$

$$feces_{inf}(t) = feces_{inf}(t-1) + pf_{inf} * I(t) * psf_{inf}(t) \quad (\text{Gl. 28})$$

Die gesamte Transmissionsfunktion (h) ist die Summe der Ansteckung über Kot oder Seide. Der Anteil der gleichzeitigen Ansteckung über Seide und Kot verhindert einen Wert der Transmissionsfunktion größer als 1,0.

$$h = dsilk_{inf}(t) * psi + dfeces_{inf}(t) * pf_i - dsilk_{inf}(t) * psi * dfeces_{inf}(t) * pf_i \quad (\text{Gl. 29})$$

2.10.2.3. Berechnung des Anteils infizierter Individuen am Beginn jeder Generation

Nosema sp. wird (mit hoher Wahrscheinlichkeit) nicht transovariell oder transovum übertragen. Deshalb soll die Dichte der toten infizierten Puppen und Falter (Gl. 30 und 31) im Verhältnis zu den Gesunden die Grundlage für die Berechnung des Anteiles infizierter Larven am Beginn der nächsten Generation sein. Tote Puppen und Falter enthalten große Sporenmengen ($> 1 \cdot 10^6$ Sporen, siehe 3.5.3.) ausreichend für eine Infektionen der Larven der nachfolgenden Generation.

Die Sporen an Seide und im Kot werden nicht mit in die Berechnung einbezogen. Es wird davon ausgegangen, dass sie nicht so zahlreich sind und sie daher in für eine Infektion ausreichender Menge nicht überleben.

Daraus folgt, dass die erfolgreiche Transmission der Mikrosporidien zur nächsten Generation abhängt:

- von der Dichte der infizierten Puppen oder Falter ($dinfecteds_{inf}(y)$) des letzten Jahres (y),
- der Wahrscheinlichkeit nach einem Kontakt mit infizierten Puppen oder Faltern ($pipa$) infiziert zu werden
- und der Anzahl gesunder frisch geschlüpfter Larven ($eggs(y-1)$).

Weiterhin wird angenommen, dass eine Infektion der nachfolgenden Generation durch tote infizierte Puppen und Falter nur während des 1. Zeitschrittes, also nur während des 1. Tages einer jeden Generation, stattfindet.

$$I(1) = dinfecteds * pipa * eggs(y-1) \quad (Gl. 30)$$

$$S(1) = (1 - dinfecteds * pipa) * eggs(y-1) \quad (Gl. 31)$$

Die Dichte der infizierten Puppen bzw. Falter ist:

$$dinfecteds(y-1) = infecteds / (infecteds + susceptibles) \quad (Gl. 32)$$

$$infecteds(y-1) = larvae_{inf}(y-1) + pupae_{inf}(y-1) + adult_{inf}(y-1) \quad (Gl. 33)$$

$$susceptibles(y-1) = larvae_{sus}(y-1) + pupae_{sus}(y-1) + adult_{sus}(y-1) \quad (Gl. _)$$

2.10.3. Sensitivitätsanalysen und Validierung

Es wurden Sensitivitätsanalysen durchgeführt, um zu ermittelt, wie groß die Änderung der Ergebnisvariablen („output“-Variablen) war, wenn einzelne oder mehrere Modellparameter verändert wurden. Tabelle 3 gibt einen Überblick darüber, welche Modellparameter und in welchen Bereichen diese variiert wurden. Als Ergebnisvariablen wurde der Anteil neuer Infektionen am Ende der 1. Generation gewählt, um die Effektivität der horizontalen Transmission innerhalb einer Generation zu analysieren und mit den Erkenntnissen aus den Laborstudien zu vergleichen. Weitere Ergebnisvariablen waren der Anteil infizierter Wirte und die Gesamtzahl der Wirte am Ende einer jeden Generation im Zeitraum von 100 Jahren, um die langfristigen Effekte zu studieren. Die Wahl des Variationsbereiches und der Schrittweite richtete sich nach den im Labor ermittelten Ergebnissen.

Tab. 3: Liste der Modellparameter, die in Sensitivitätsanalysen variiert wurden

Parameter	Variationsbereich	Schrittweite
Latenzperiode	1 ... 15 Tage	1 Tag
	5 ... 25 Tage	5 Tage
Latenzperiode & Entwicklungsdauer gesunder Larven	8 ... 15 Tage &	1 Tag
	18 ... 34 Tage	2 Tage
Larvenmortalität	5 ... 95 %	10 %
Puppenmortalität	5 ... 95 %	10 %
Schlupftage	1 ... 14 Tage	2 Tage
<u>Transmission über Seide</u>		
Ansteckungswahrscheinlichkeit	10 ... 100 %	10 %
Wahrscheinlichkeit von Seide	10 ... 100 %	10 %
Wahrscheinlichkeit von Sporen auf der Seide	10 ... 100 %	10 %
<u>Transmission über Kot</u>		
Ansteckungswahrscheinlichkeit	10 ... 100 %	10 %
Abgabe von Kot	Funktionen s. Tab. 19	
Anteil infizierter Individuen in der F1-Generation	5 ... 95 %	10 %
Fertilität	600 / 300 / 150 Eier je Gelege	
Natalität	100 / 60 / 40 / 20 %	