

# Schlussbericht

## **Titel des Projektes**

Etablierung einer Extraktionsmethode für Eier von *Diabrotica virgifera virgifera* aus Bodenproben.

## **Projektlaufzeit**

01.04.2009–31.12.2011

## **Durchführende Institution**

BTL Bio-Test Labor GmbH Sagerheide  
Forschungsgruppe Phyto-Entomologie  
Birkenallee 19  
18184 Thulendorf/Sagerheide, Deutschland  
Tel.: 038204 12981  
Fax: 038204 12980,

## **Projektleiter**

Dr. Thomas Thieme, E-Mail: tt@biotestlab.de

## **Projektbearbeiter**

Kai Gloyna, E-Mail: kg@biotestlab.de

## **Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz, IPS 3d  
Lange Point 10, D-85354 Freising, Deutschland

AGRO DS Österreich, Technisches Büro  
Untere Hauptstrasse 22 A, A-7041 Wulkaprodersdorf, Österreich

Banat University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine  
Calea Aradului nr.119, RO-300645 Timișoara, Romania

# 1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

## 1.1. Planung und Ablauf des Vorhabens

Die Prognostizierung des durch den aus den USA in Europa eingeschleppten Westlichen Maiswurzelbohrers, *Diabrotica virgifera virgifera*, zu erwartenden Schadens und die Festlegung erforderlicher Bekämpfungsstrategien kann a) durch die Erfassung adulter Tiere im Vorjahr, oder b) durch die Extraktion der Eier aus Bodenproben erfolgen. Da die Erfassung adulter Käfer stark wetter- und tageszeitabhängig ist und darüber hinaus in hohem Maße durch die Phänologie der Maispflanzen beeinflusst wird, ist eine Korrelation zum Befall im Folgejahr nicht immer gegeben. Die im Boden abgelegten Eier besitzen dagegen einen direkten Bezug zu den schädigenden Larven und können über einen längeren Zeitraum hinweg in dem zu untersuchenden Schlag erfasst werden. Trotz vorhandener Nachteile (heterogene horizontale und vertikale Verteilung, zeitaufwendige Extraktion/Zählung) ist eine Prognostizierung der zu erwartenden Befallsstärke durch die Bestimmung der Ei-Dichte möglich. Darüber hinaus können durch das Auswaschen von Eiern auch biologische Fragestellungen zum Eiablageverhalten von *D. v. virgifera* beantwortet werden.

Ziel der Untersuchungen sollte daher die Erarbeitung einer Methode zur Extraktion von *Diabrotica*-Eiern aus Bodenproben sein. Hierfür sollen auch Eier anderer Organismen mit definierter Stückzahl in Böden unterschiedlicher Art und Struktur überführt und die zu etablierende Methode damit getestet werden. Die Methode ist derartig zu optimieren, dass in kurzer Zeit ein großer Probendurchsatz ermöglicht wird. Anschließend ist ein geeignetes Design für die Probenentnahme im Feld zu entwickeln, mit dessen Hilfe auch ein geklumpstes Auftreten von Eiern repräsentativ erfasst werden kann. Folgende sich ergebende Aufgabenbereiche (Teilaufgaben, TA) waren zu bearbeiten:

- TA 1 Literaturrecherche
- TA 2 Planung und Bau des Ei-Waschapparates
- TA 3 Validierung der Funktionsfähigkeit
- TA 4 Entwicklung eines Designs für die Probenentnahme im Feld

## 1.2. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Veröffentlichungen aus den USA und Europa (u.a. FOSTER et al. 1979; MATTESON 1966; PARK & TOLLEFSON 2006; SHAW et al. 1976; RUESINK, 1986; UJVARI et al. 2004) zeigen, dass Auswaschverfahren mit Sieben verschiedener Maschenweite und einem anschließendem Aufschwemmen quantitative Angaben über die im Boden abgelegten Eier liefern können. Einige Faktoren machen es aber erforderlich, die Adaptationsmöglichkeit der in den USA und SE-Europa praktizierten Methoden zu prüfen. Die in den USA anzutreffenden Felder sind wesentlich größer als in Europa, mithin ist bei den dortigen Bodenproben von einer geringeren Variabilität der Bodenarten und -strukturen auszugehen. Unbekannt ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt auch, ob durch die andere faunistische Ausstattung europäischer Felder, Eier anderer

Organismen in den Bodenproben auftreten, die eine Quantifizierung der Eizahlen von *D. v. virgifera* erschweren.

Der Projektnehmer hat eine Umgangsgenehmigung für *D. v. virgifera* europäischer und nordamerikanischer Abstammung und Erfahrungen in der Arbeit mit verschiedenen *Diabrotica*-Arten und -Stämmen. Verschiedene *Diabrotica*-Stämme werden vom Projektnehmer gezüchtet und stehen für die Versuchsdurchführung zur Verfügung. Der Projektnehmer verfügt zudem über Erfahrungen im Umgang und in der Zucht verschiedener Arthropoden. Darunter befinden sich auch diverse Käferarten, die unter standardisierten Bedingungen gehalten und für Zulassungsversuche (nach GLP) in verschiedenen europäischen Laboratorien der Agrochemieindustrie sowie öffentliche und private Prüfeinrichtungen eingesetzt werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Darstellung der wichtigsten Methoden**

#### **2.1.1. Planung und Bau des Ei-Waschapparates**

Zunächst wurden in einer umfangreichen Literaturrecherche Methoden zur Bestimmung der Ei-Dichte verschiedener Organismen identifiziert. Um zu klären, ob neben den von RUESINK (1986) zusammengestellten Methoden der Auswaschung von Bodenproben auch andere beschriebene Praktiken nutzbar sind, wurden auch Publikationen berücksichtigt, die sich nicht mit *D. v. virgifera*, sondern mit anderen Tierarten beschäftigen (z.B. Nematoda). Auf Basis erster Ergebnisse wurde die geplante Methodik der Ei-Extraktion aus Bodenproben erweitert und angepasst.

Die Fertigstellung der Ei-Waschmaschine verzögerte sich mehrfach und erfolgte erst zum Herbst 2010. Viele Bauteile, insbesondere die Siebtrommel mussten aufgrund von Anpassungsproblemen mehrfach angefertigt werden.

In Versuchen wurden weitere Anpassungen durchgeführt, insbesondere in der Drehzahlsteuerung und Aufhängung des Motors. Für die Auswahl der zu nutzenden Maschenweiten der verschiedenen Siebe wurden *Diabrotica*-Eier verschiedenen Alters und Entwicklungsstandes vermessen. Für die Bestimmung der Anzahl ausgewaschener Eier durchläuft jede einzelne Bodenprobe eine Siebkaskade. In der letzten Siebfraktion werden alle die Partikel aufgefangen, die kleiner 550 µm und größer 250 µm sind. Zur Abtrennung der Eier von den anderen Partikeln gleicher Größe wurde die letzte Siebfraktion in einen Scheidetrichter mit 1000 ml 2 M MgSO<sub>4</sub>-Lösung überführt, in der die Eier aufschwammen (Abb. 1). Nach Ablass der schwereren Partikel wurde der Scheidetrichter mit Wasser aufgefüllt. Zusammen mit anderen Objekten gleicher Dichte sedimentierten die Eier im Wasser (Abb. 2) und konnten in einem Sieb (250 µm Maschenweite) aufgefangen werden. Die Auszählung der Eier erfolgte danach unter einem Stereo-Mikroskop.



Abb. 1: Flotation der Eier in einer  $MgSO_4$ -Lsg



Abb. 2: Sedimentation der Eier im Wasser

### 2.1.2. Validierung der Funktionsfähigkeit

Für die Validierung der Methode wurden Eier von *D. v. virgifera* in definierten Stückzahlen in Bodenproben inokuliert und die Anzahl der extrahierten Eier ermittelt. Dafür wurden die Anordnung und Funktionsweisen der einzelnen Komponenten (Siebe, Maschenweite, Druck und Menge des für Waschvorgänge benötigten Wassers etc.) variiert und optimiert. In der Literatur werden Wiederfunde von 70–95 % beschrieben (z.B. SHAW & HUMMEL 2003; TAKÁCS et al. 2005).

#### Zusätzliche Arbeiten

Als zusätzliche Prüfgröße bei der Extraktion der Eier aus Feldproben wurden in mehreren Proben je 10 gefärbte Eier inokuliert. Die Anzahl wiedergefundener Eier wurde nach Durchlauf des vollständigen Waschprozesses registriert. Zur Anfärbung wurden Eier von *D. v. virgifera* in einer Zucht produziert und nach der im Anhang 1 vorgestellten Verfahrensweise mit Giemsa gefärbt.

### 2.1.3. Entwicklung eines Designs für die Probenentnahme im Feld

Für die Optimierung der Probenentnahme im Feld wurden mit verschiedenen Geräten (Spaten, Schaufel und Stechrohren) Bodenproben entnommen und in unterschiedlichen Mengen in die Ei-Waschapparatur überführt. Nach verschiedenen Durchlaufzeiten wurden die Größenzusammensetzungen der Siebfraktionen untersucht. Zusammen mit den Literaturbefunden ermöglichten die erzielten Ergebnisse die Festlegung eines Designs für die Probenentnahme. Dieses Design wurde 2011 in den Feldversuchen in Österreich und Rumänien eingesetzt. Die entsprechenden Versuche erfolgten in enger Kooperation mit der AG Grabenweger, Wien, der AG Foltin, Wulkaprodersdorf und der AG Lauer/Gräpel, Timișoara, Rumänien.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Ausführliche Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

Die Arbeiten und Versuche wurden fortlaufend mit den das Projekt koordinierenden Kollegen des Instituts für Pflanzenschutz der LfL Bayern in Freising abgestimmt. Zwischenergebnisse wurden diskutiert und notwendige Änderungen in der Versuchsdurchführung besprochen. Darüber hinaus erfolgte eine enge Kooperation mit Kollegen aus Österreich (AG Foltin, Wulkaprodersdorf) und Rumänien (AG Lauer/Gräpel, Timișoara), die Probenmaterial aus Feldversuchen zur Verfügung stellten.

##### 3.1.1 Bau des Ei-Waschapparates

Es wurde ein Ei-Waschapparat konstruiert und gebaut, welcher kontinuierlich einen größeren Probendurchsatz gestattet. Bei der in den USA am häufigsten eingesetzten Technik wird durch eine rotierende Siebtrommel die Bodenprobe geschwemmt, deren letzte Fraktion die Eier der Zielgruppe enthält (Abb. 3 & 4). Dieses Konstruktionsprinzip wurde modifiziert auch vom Projektnehmer genutzt.

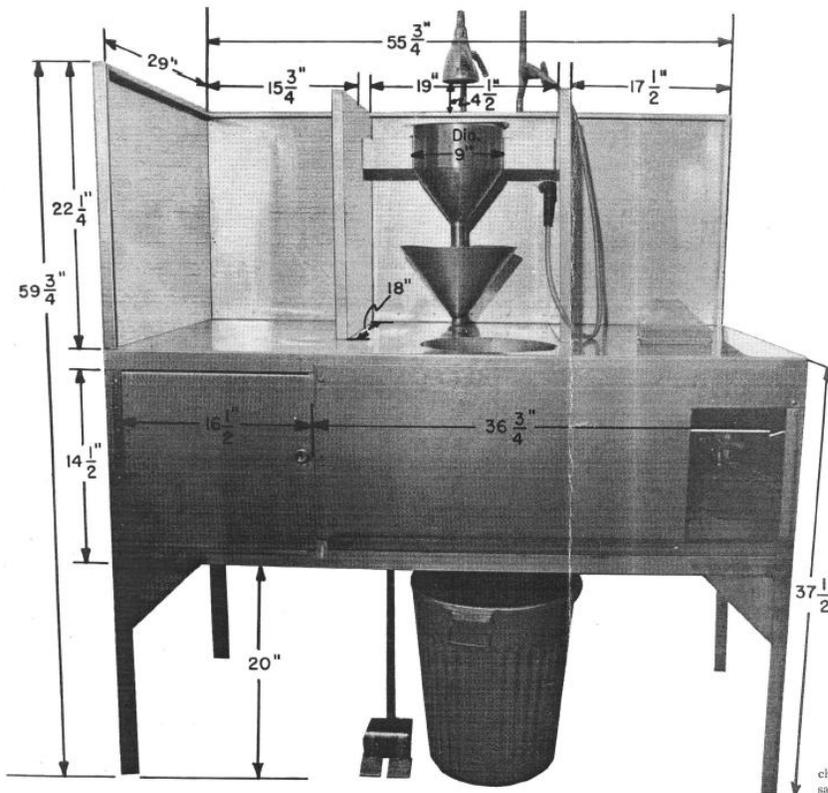


Fig. 2.—Nine-inch diameter funnel with stainless steel sieve insert. A soil sample is placed in the sieve and sprayed with water from the shower head.

Fig. 1.—External view, with dimensions, of machine used to extract corn rootworm eggs from a sample of soil.

Abb. 3: "Egg-Extraktor" aus SHAW et al. 1976



Abb. 4: Detail der Wasserführung in einem amerikanischen "Egg-Extraktor" (J. Spencer, Illionois; persönl. Mitteilung)

Über die Größe von *Diabrotica*-Eiern stehen nur grobe Angaben zur Verfügung (z.B. GILLETTE 1912). Deshalb wurden für die Auswahl der zu nutzenden Maschenweiten der verschiedenen Siebe wurden *Diabrotica*-Eier verschiedenen Alters und Entwicklungsstandes vermessen (Tab. 1).

Tab. 1: Mittlere Länge und Breite der Eier von *D. v. virgifera* aus einer diapausierenden Zucht (Herkunft: Ungarn). (Werte in Klammern: Minimal- bzw. Maximalwerte)

Länge (mm)	Breite (mm)	Anzahl vermessener Eier
0,63 (0,54-0,69)	0,40 (0,34-0,46)	27

Da die Erdproben in einem kontinuierlichen Wasserstrom durch/über die Siebe geschwemmt werden, wurden das Vorsieb mit einer Maschenweite von 550 µm und die Siebtrommel mit einer Maschenweite von 250 µm gebaut.

Die Apparatur wurde so konzipiert, dass einzelne Bauteile nach Möglichkeit verschraubt werden, um eventuelle Änderungen zu einem späteren Zeitpunkt mit geringem Aufwand zu ermöglichen (Abb. 5). Zur Vermeidung von Korrosionsschäden wurden (soweit möglich) alle mit Wasser in Berührung kommenden Bauteile aus Edelstahl (A2) gefertigt (Abb. 6 & 7). Um einen eventuellen Transport des Geräts auch in einem Pkw-Kombi zu ermöglichen, sind Korpus und Beine des Geräts ebenfalls verschraubt.

Konstruktive Veränderungen und Neufertigungen durch die ausführende Firma SUR Laser- und Metalltechnik GmbH waren insbesondere für die Siebtrommel und deren Lagerung (Abb. 8 & 9), den Motor inklusive Aufhängung und Steuerung, die Kraftübertragung zwischen Motor und Siebtrommel sowie die Führung der Düsen tragenden Wasserleitung (Abb. 10-12) erforderlich.



Abb. 5–6: Fertigungsstand der Ei-Waschanlage November 2009, Korpus (5), Durchflusstrichter (6)

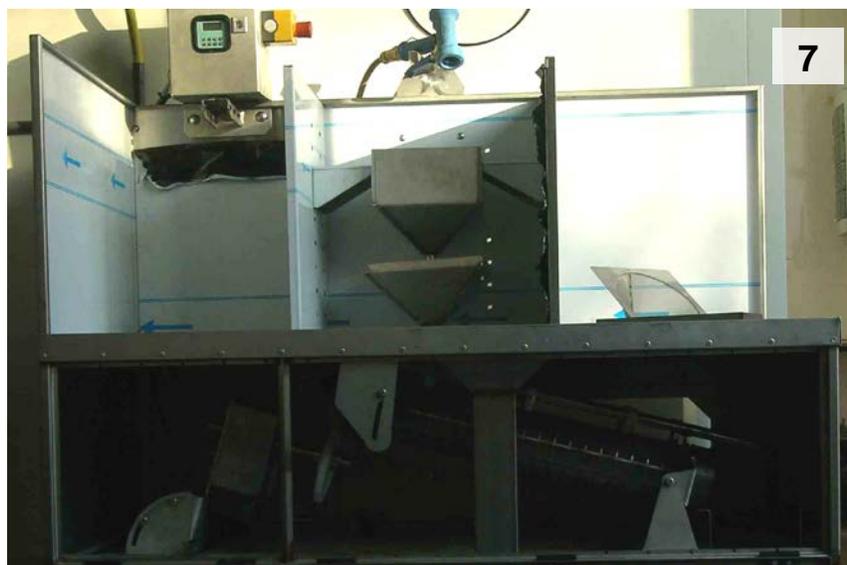


Abb. 7: Fertigungsstand der Ei-Waschanlage Dezember 2010



Abb. 8–9: „Alte“ (8) und „Neue“ Siebtrommel (9)



Abb. 10–12: Details der verstärkten und verstellbaren Motoraufhängung (10), Kraftübertragung zur Siebtrommel (11) und Drehzahlsteuerung (12)

In den amerikanischen Apparaturen zur Eier-Auswaschung ist es üblich, zur Aufhängung der Siebtrommel eine innen liegende Achse zu verwenden. Bei der Erprobung eines ersten eigenen Prototyps stellte der Projektnehmer fest, dass hierdurch die Möglichkeiten zur Modifikation der Technik eingeschränkt werden. Deshalb modifizierte der Projektnehmer dieses Detail und nutzte für die Siebtrommel eine äußere Lagerung (mit Führung der Siebtrommel in Kugellagern, Abb. 11).

### 3.1.2. Validierung der Funktionsfähigkeit

Für die Validierung der Ei-Waschapparatur wurden Eier von *D. v. virgifera* in definierten Stückzahlen in Bodenproben inokuliert und die Anzahl der extrahierten Eier ermittelt. Dafür wurden die Anordnung und Funktionsweisen der einzelnen Komponenten (Siebe, Maschenweite, Druck und Menge des für Waschvorgänge benötigten Wassers etc.) variiert und optimiert. In der Literatur werden 70–95 % Wiederfunde beschrieben (z.B. SHAW & HUMMEL 2003; TAKÁCS et al. 2005).

#### Zusätzliche Arbeiten

Als zusätzliche Prüfgröße und zur internen Qualitätssicherung bei der Extraktion der Eier aus Feldproben, wurden in mehreren Proben je 10 gefärbte Eier inokuliert. Die Anzahl wiedergefundener Eier wurde nach Durchlauf des vollständigen

Waschprozesses registriert (Tab. 2, Abb. 13). Hierfür wurden Eier von *D. v. virgifera* in einer Zucht produziert, 10 min in 99 %-igem Methanol fixiert und gebleicht und anschließend in unverdünnter Giemsa Stammlösung 25 min leuchtend blau gefärbt (siehe Anhang).

Tab. 2: Anzahl der aus unterschiedlichen Volumina des Probenmaterials ausgewaschenen und gefärbten Eier von *D. v. virgifera* aus Erdproben von Österreich und Rumänien (Von den aus einer Laborzucht stammenden angefärbten Eiern wurden je 10 in die Bodenprobe inokuliert)

Herkunft	Bodenprobe		Eier (n)
	Art	Gesamtvol. (ml)	
<b>Österreich</b>			
Raabfeld (26.05.11)	Feuchtschwarzerde sL	380	9
Dornau (24.05.11)	Braunerde sL	650	7
	Braunerde sL	580	9
Dedenitz (24.05.11)	Alluviale Braunerde sL	610	9
	Alluviale Braunerde sL	500	10
<b>Rumänien</b>			
Grabatz (11.05.11)	Schwarzerde	1600	5
Mittlere Wiederfunde (%)			81.7 ± 18,3

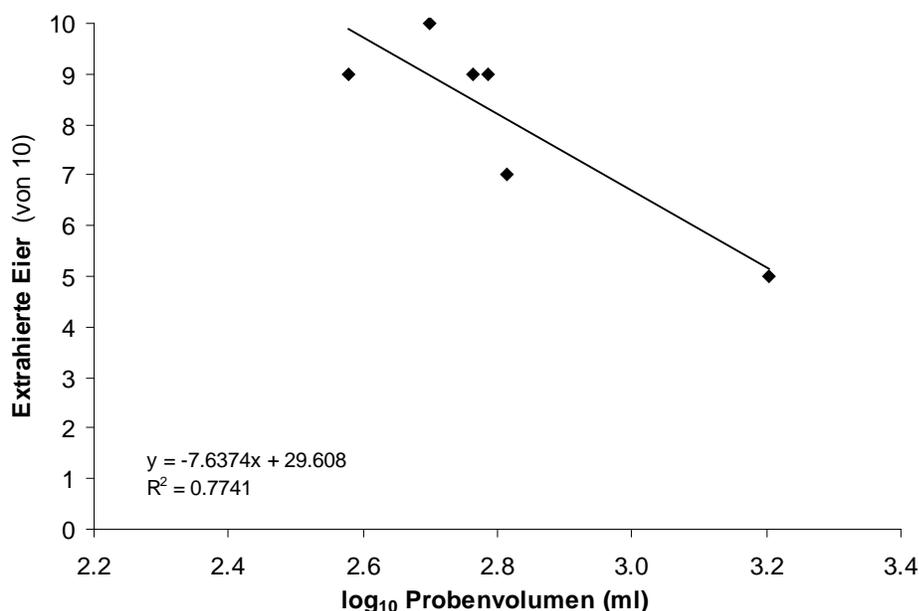


Abb. 13: Einfluss der Größe der Proben volumina auf die Anzahl wiedergefundener (gefärbter) Eier von *D. v. virgifera* in der Ei-Waschanlage (Je Bodenprobe wurden 10 angefärbte Eier aus einer Laborzucht inokuliert)

Zwischen Größe/Volumen der in die Ei-Waschanlage überführten Bodenprobe und der Anzahl extrahierter Eier besteht ein indirekter Zusammenhang (Abb. 13). Die zur Auswaschung in den Apparat überführte Bodenprobe sollte deshalb nicht größer als 750 ml sein.

Die unter Berücksichtigung dieser Vorgaben extrahierten Bodenproben enthielten relativ geringe Stückzahlen von *D. v. virgifera* –Eiern (Tab. 3).

Tab. 3: Anzahl (Mittelwert  $\pm$  SD) der je Liter Probenmaterial ausgewaschenen Eier von *D. v. virgifera* aus Erdproben von Österreich und Rumänien (ÖK Ölkürbis)

<b>Herkunft</b>	<b>Proben Entnahmeort im Feld</b>	<b>(n)</b>	<b>Ausgewaschene Eier (n)</b>
<b>Österreich</b>			
Bruckneudorf (11.05.11)	Mitte	2	0,0 $\pm$ 0,0
	Rand	2	0,0 $\pm$ 0,0
Dedenitz (24.05.11)	ÖK	2	0,0 $\pm$ 0,0
	Rand	2	0,0 $\pm$ 0,0
	Rand ÖK	2	0,0 $\pm$ 0,0
Deutsch Jahrndorf (18.05.11)	Mitte	2	1,5 $\pm$ 0,4
	Rand	2	4,8 $\pm$ 4,7
	(01.06.11) Mitte	2	0,0 $\pm$ 0,0
	Rand	2	0,7 $\pm$ 0,9
Dornau (24.05.11)	ÖK	2	0,0 $\pm$ 0,0
	Rand	2	0,0 $\pm$ 0,0
	Rand ÖK	2	0,0 $\pm$ 0,0
Raabfeld (26.05.11)	Mitte	2	0,0 $\pm$ 0,0
	Rand	2	0,0 $\pm$ 0,0
Wallern (18.05.11)	Mitte	2	0,0 $\pm$ 0,0
	Rand	2	0,0 $\pm$ 0,0
Zuberbach (26.05.11)	Mitte	2	0,0 $\pm$ 0,0
	Rand	2	2,0 $\pm$ 1,2
<b>Rumänien</b>			
Iecae Mare (11.05.11)	Mitte	4	1,0 $\pm$ 1,5
	Rand	2	0,0 $\pm$ 0,0
Grabatz (11.05.11)	Mitte	2	0,8 $\pm$ 1,2
	Rand	2	1,1 $\pm$ 0,2
Lenuaheim (11.05.11)	Mitte	2	0,0 $\pm$ 0,0
	Rand	2	0,0 $\pm$ 0,0

Bei der Zählung der Eier unter dem Stereo-Mikroskop war die Präsenz von Eiern erkennbar, die von anderen Tierarten abgelegt wurden. Da sie in ihrer Größe und Dichte den *Diabrotica*-Eiern entsprachen, konnten sie nicht während des Auswaschvorganges separiert werden. *Diabrotica*-Eier besitzen aber eine typische Skulpturierung der Oberfläche und können somit sicher von den Eiern anderer Tierarten unterschieden werden (ATEYO et al. 1964; ROWLEY & PETERS, 1972; Abb. 14).



Abb. 14: Aus einer Bodenprobe extrahierte Eier gleicher Größe und Dichte. Das Ei von *D. v. virgifera* (Dv) ist durch die Skulpturierung der Oberfläche identifizierbar.

### 3.1.3. Entwicklung eines Designs für die Probenentnahme im Feld

Nach Diskussion mit den Kooperationspartnern sowie unter Berücksichtigung der im Feld gewonnenen Erfahrungen und der Literatur (z. B. BERGMANN et al. 1981; CHIANG et al. 1969; FOSTER et al. 1979; GERRARD & CHIANG, 1970; GRAY et al. 1992; GUNDERSON, 1964; HEIN et al. 1985; PARK & TOLLEFSON, 2006; RUESINK & SHAW, 1983; RUESINK, 1986; Weiss et al. 1983) wurde folgende Standardarbeitsanweisung (SOP) für die Entnahme von Bodenproben erarbeitet (Abb. 15).

#### „SOP der Bodenprobennahme für die Eier-Auswaschung

Als Probenstecher kann ein Nematodenstecher verwendet werden, dabei muss die Entnahme von Bodenproben mindestens bis zu einer Tiefe von 15 cm besser noch 20 cm möglich sein.

Pro Parzelle werden so viele Bohrkerne genommen, dass ein Volumen von 6 Litern erreicht wird. Die Proben je Parzelle werden gesiebt (Sieb mit ca. 0,5-1 cm

Maschenweite) um eine optimale Vermischung zu erreichen und um Wurzeln und Steine zu entfernen. Von der Probe werden zwei Unterproben von jeweils 0,5 l für die Untersuchung abgepackt. Die Bohrkernsollen gleichmäßig verteilt, d.h. in einem Raster verteilt, auf einer Länge von 10 m gezogen werden. Dabei sollen je 2 l der Probe von der Pflanzenbasis, 2 l in der Reihe und 2 l zwischen den Reihen genommen werden.

Die Proben werden in Gefrierbeuteln verpackt. Die Gefrierbeutel sollten mindestens 5 l Fassungsvermögen haben und werden nur zu einem Drittel gefüllt. Jeder Beutel muss deutlich mit der Proben-Nr. gekennzeichnet sein, entweder durch Einlegen eines Zettels oder durch eine wasserfeste Beschriftung auf dem Beutel.

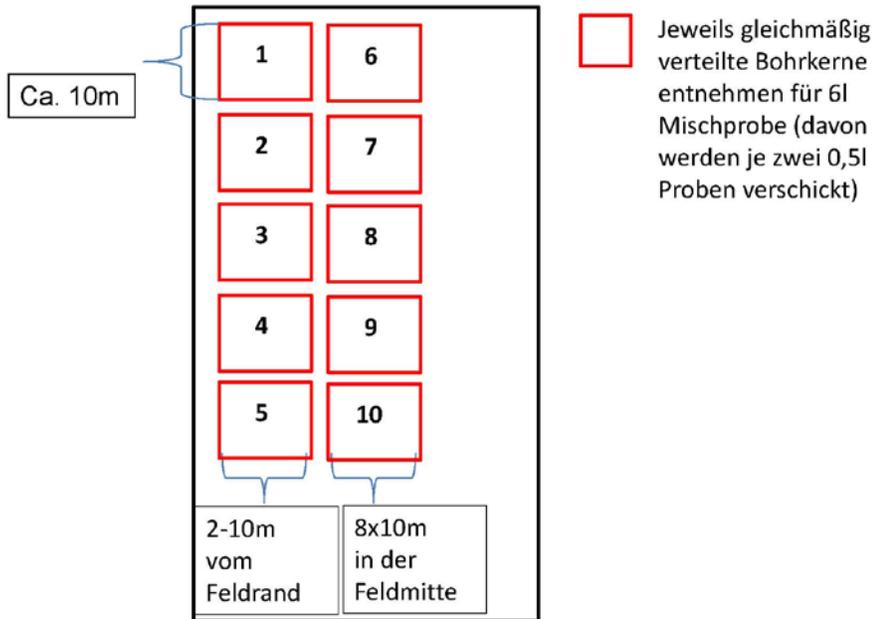
Der „authority letter“ des Pflanzenschutzdienstes Mecklenburg-Vorpommern kann noch einmal verwendet werden, d.h. er muss von dem örtlichen verantwortlichen Pflanzenschutzdienst gegengezeichnet und gestempelt werden und den Paketen zum Versand beigelegt werden. Zusätzlich wird der Probenbegleitschein ausgefüllt und mit gesandt. Es wäre wünschenswert wenn zusätzlich die Angaben Hangneigung, Postleitzahl und wenn möglich die Koordinaten der Fläche eingetragen werden könnten. Die Pakete zu Händen des BTL Sagerheide sollten so stabil wie möglich gepackt sein, die Proben eines Schläges in jeweils einem eigenen Paket.

Der Anhang zeigt die Probennahme. Es sollen auf jeweils stark befallenen Maisschlägen in der Steiermark und im Burgenland je Schlag 10 Mischproben genommen werden. Dabei besteht, wie oben beschrieben, eine 6 l-Mischprobe aus einzelnen Bohrkernen. Die Mischproben Nr.1-5 sollen 2-10 m vom Feldrand, auf einer Länge von ca. 10 m verteilt, genommen werden. Sollten 10 m nicht möglich sein, so ist auch eine Verkürzung bis auf 5 m denkbar. Die Proben Nr. 6-10 sollen mitten im Feld auf einer Länge von ca. 10 m genommen werden. Auf Schlägen in der Steiermark sollen zusätzlich auf stark befallenen Maisschlägen in Nachbarschaft zu Ölkürbis Proben genommen werden. Dabei muss zur Zeit der Eiablage das jeweilige Nachbarfeld mit Ölkürbis bestellt gewesen sein. Die Mischproben Nr. 1-5 werden auf 2-10 m auf der Seite des (vorjährigen) Kürbisfeldes in den Maisschlag hinein genommen und die Proben Nr. 6-10 auf 2-10 m vom anderen Rand des Maisfeldes hinein genommen werden. In dem (vorjährigen) Ölkürbisschlag werden die Proben Nr. 11-15 ca. 2-10 m von der Seite zum Maisschlag hinein genommen. Diese Proben werden auf einer Länge von ca. 10m genommen. Wie oben beschrieben ist eine Verkürzung auf bis zu 5 m denkbar, sollte die Fläche nicht ausreichen. Je Probe sollen von den 6 l jeweils 2 l von der Basis der Pflanze, in der Reihe und zwischen den Reihen genommen werden.“

Dieses Design wurde von den Projektpartnern in Österreich und Rumänien angewandt zur Entnahme weiterer Erdproben, die nach Ende der Projektlaufzeit bearbeitet werden.

### Probennahme auf Schlägen in der Steiermark und im Burgenland

Stark befallener Mais



### Probennahme auf Schlägen in der Steiermark

Ölkürbis zur Eiablage

Stark befallener Mais

z.B. Getreide zur Eiablage

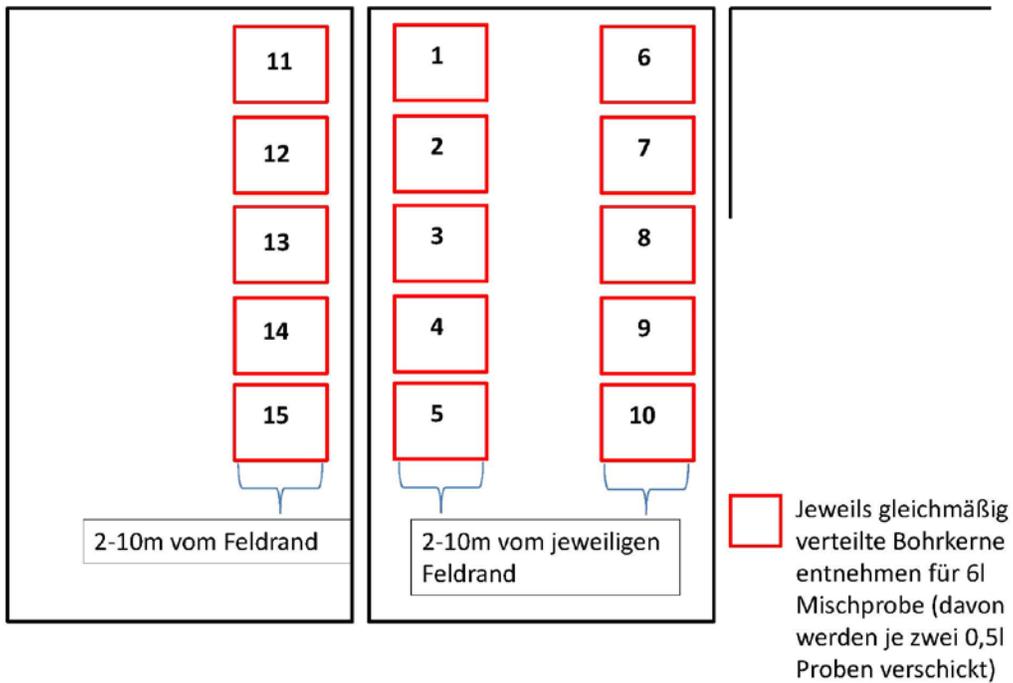


Abb. 15: Schema der Probenentnahme für die Auswaschung der Eier von *D. v. virgifera* aus Erdproben verschiedener Felder in Österreich

### 3.2. Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Der konstruierte, gebaute und erprobte Eier-Waschapparat ermöglicht bei kontinuierlicher Anwendung die Bearbeitung eines großen Probenumfangs. Bei Berücksichtigung des in Zusammenarbeit mit den Projektpartnern erarbeiteten Designs für die Entnahme von Bodenproben wird es der Einsatz der Eier-Waschapparatur ermöglichen, die im Boden abgelegten *Diabrotica*-Eier quantitativ und qualitativ zu erfassen.

Hierdurch wird eine Prognostizierung der zu erwartenden Befallsstärke durch die Bestimmung der Ei-Dichte möglich. Darüber hinaus können durch das Auswaschen von Eiern auch biologische Fragestellungen zum Eiablageverhalten von *D. v. virgifera* beantwortet und Daten für die Modellierung der Populationsdynamik dieses Schaderregers gewonnen werden.

### 4. Zusammenfassung

Für die Prognostizierung der durch den in Europa eingeschleppten Quarantäneschaderreger, *Diabrotica virgifera virgifera*, zu erwartenden Schäden und die Festlegung erforderlicher Bekämpfungsstrategien sind Kenntnisse über die Eiablage des Käfers (Anzahl, Ablegeort, Verteilung) von Interesse. Zur Bestimmung der Anzahl abgelegter Eier wurde ein Apparat konstruiert, gebaut und erprobt, der transportabel ist und einen hohen Probendurchsatz ermöglicht. Das Konstruktionsprinzip orientiert sich an Geräten, die in den USA Verwendung finden. Die Auswaschung erfolgt nach Siebung mit 550 µm in einer rotierenden Siebtrommel mit 250 µm Maschenweite. Aus der zurückbleibenden Siebfraktion können durch Flotation in MgSO<sub>4</sub>-Lsg und anschließende Ausfällung in Wasser die *Diabrotica*-Eier extrahiert werden. Die Auszählung der Eier erfolgt unter dem Mikroskop.

*Diabrotica*-Eier besitzen eine typische Skulpturierung der Oberfläche und lassen sich unter dem Mikroskop von Eiern anderer Tierarten unterscheiden, die in ihrer Größe und Dichte *Diabrotica*-Eiern entsprechen und deshalb nicht während des Auswaschvorganges separiert werden können.

Die Funktionssicherheit wurde durch Einsatz von mit *Diabrotica*-Eiern gespickten Proben überprüft. In Zusammenarbeit mit dem Projektgeber und Projektpartnern in Österreich und Rumänien konnte anschließend ein geeignetes Design für die Probenentnahme im Feld entwickelt werden. Dieses Design berücksichtigt die heterogene horizontale und vertikale Verteilung der *Diabrotica*-Eier im Feld und die Machbarkeit der erforderlichen Feldarbeiten.

### 5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen; ggf. mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen

– Haben sich die Aussichten für die Erreichung der Ziele innerhalb des angegebenen Berichtszeitraums gegenüber den geplanten Aufgaben im Forschungsprogramm geändert (Falls ja, notwendige Änderungen in der Zielsetzung begründen)? –

Aus gesundheitlichen Gründen des Bearbeiters und Schwierigkeiten bei der Anzucht adulter Tiere, kam es in der Projektbearbeitung anfänglich zu Verzögerungen. Bis zum

Ende der Projektdauer war es jedoch möglich, alle geplanten Leistungen und zusätzliche, am Anfang nicht vorhergesehene Arbeiten, zu erbringen.

– Sind inzwischen von dritter Seite Ergebnisse bekannt geworden, die für die Durchführung des Projektes relevant sind?

Der Projektnehmer nutzt regelmäßig Literaturdatenbanken (Web of Knowledge, Zoological Record, Scopus etc.) um aktuelle Publikationen zu sichten und in eine vorhandene Literaturdatenbank einzupflegen. Im abgelaufenen Berichtszeitraum wurden nach Wissen des Projektnehmers keine Ergebnisse publiziert, die für die Durchführung des Projekts relevant sind.

– Sind oder werden Änderungen in der Zielsetzung notwendig? –

Änderungen der formulierten Zielstellungen waren nicht notwendig.

## 6. Literaturverzeichnis

ATYEO WT, WEEKMAN GT & LAWSON DE (1964) The identification of *Diabrotica* species by chorion sculpturing. *Journal of the Kansas Entomological Society* **37**: 9–11.

BERGMAN MK, TOLLEFSON JJ & HINZ PN (1981) Sampling scheme for estimating populations of corn rootworm larvae. *Environmental Entomology* **10**: 986–990.

FOSTER RE, RUESINK WG & LUCKMANN WH (1979) Northern corn rootworm egg sampling. *Journal of Economic Entomology* **72**: 659–663.

CHIANG HC, SISSON V & RASMUSSEN D (1969) Conversion of results of concentrated samples to density estimates of egg and larval populations of the northern corn rootworm. *Journal of Economic Entomology* **62**: 578–583.

GERRARD DJ & CHIANG HC (1970) Density estimation of corn rootworm egg populations based upon frequency of occurrence. *Ecology* **51**: 237–245.

GILLETTE CP (1912) *Diabrotica virgifera* LeConte as a corn root-worm. *Journal of Economic Entomology* **5**: 364–366.

GRAY ME, HEIN GL, BOETEL MA & WALGENBACH DD (1992) Western and northern corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) egg densities at three soil depths: implications for future ecological studies. *Journal of the Kansas Entomological Society* **65**: 354–356.

GUNDERSON H (1964) Proposal on uniform sampling technique for rootworm eggs. *Proceedings of the North Central Branch of the Entomological Society of America* **19**: 97.

HEIN GL, TOLLEFSON JJ & HINZ PN (1985) Design and cost considerations in the sampling of northern and western corn-rootworm (Coleoptera, Chrysomelidae) eggs. *Journal of Economic Entomology* **78**: 1495–1499.

MATTESON JW (1966) Flotation technique for extracting eggs of *Diabrotica* spp. and other organisms from soil. *Journal of Economic Entomology*. **59**: 223–224.

PALMER DF, Windels MB, CHIANG HC (1976) Changes in specific gravity of developing western corn rootworm eggs. *Environmental Entomology*. **5**: 621–622.

- PARK YL & TOLLEFSON JJ (2006) Spatial distributions of corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) eggs and larvae: Implications for sampling. *Journal of the Kansas Entomological Society* **79**: 129–135.
- ROWLEY WA & PETERS DC (1972) Scanning electron microscopy of the eggshell of four species of *Diabrotica* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Annals of the Entomological Society of America* **65**: 1188–1191.
- RUESINK WG & SHAW JT (1983) Evaluation of a trench method for sampling eggs of the northern and western corn rootworms (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology* **76**: 1195–1198.
- RUESINK WG (1986) Egg sampling techniques. In *Methods for the study of pest Diabrotica* (ed. by JL KRYSAN & TA MILLER), Springer Series in Experimental Entomology, 1. Springer-Verlag, New York, pp. 83–99.
- SHAW JT, ELLIS RO & LUCKMANN WH (1976) Apparatus and procedure for extracting corn rootworm eggs from soil. *Illinois Natural History Survey Biological Notes* **96**: unpaginated, 4 pp.
- SHAW JT, HUMMEL HE (2003) *Diabrotica* egg separation from soil: An efficient and fast procedure for monitoring egg stages of corn rootworm populations. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. **68**: 73–77.
- TAKÁCS T, BALOGH P, NÁDASY M (2005) Quick scouting of eggs of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte, 1868) from soil. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. **70**: 693–696.
- UJVARI Z, HOFFMANN P, KISS J, VOROS G (2004) Washing the eggs of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera* LeConte) from the soil. *Novenyvedelem*. **40**: 537–540.
- WEISS MJ, MAYO ZB & NEWTON JP (1983) Influence of irrigation practices on the spatial distribution of corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) eggs in the soil. *Environmental Entomology* **12**: 1293–1295.

## 7. Anhang

Verfahrensweise zur Anfärbung der Eier von *D. v. virgifera*  
– für die Prüfung des Qualitäts-Standards bei der Analyse von Bodenproben –

1. Auswaschen der Eier mit einem 250 µm Sieb
2. zur Trennung von verbliebenen mineralischer Bestandteilen in 2 M MgSO<sub>4</sub>-Lösung aufschwemmen und anschließend mehrfach in Wasser spülen
3. 10' in 99%-igem Methanol inkubieren (Fixierung und leichte Bleichung der Eier)
4. 20–30' Färbung in der unverdünnten Giemsa Stammlösung (Carl Roth: T862.1)
5. mehrmals mit Wasser nachspülen
6. je 10 Eier in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführen
7. gefärbte Eier im Kühlschrank lagern