

Technische Universität München

Lehrstuhl für Tierökologie

Emission von Kommunikationsstoffen des Buchdruckers:
Effekt auf Artgenossen und zeitlicher Verlauf

Lars Lehmborg

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigte Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. W. Oßwald

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. R. Schopf
2. Univ.-Prof. Dr. A. Menzel

Die Dissertation wurde am 13.09.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 10.01.2013 angenommen.

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung:	- 6 -
2	Material und Methoden:	- 15 -
2.1	Untersuchungsgebiet der Freilandversuche	- 15 -
2.2	Versuchstiere	- 16 -
2.2.1	Laborzucht.....	- 16 -
2.2.2	Geschlechtsbestimmung.....	- 18 -
2.3	Sammelsysteme für flüchtige organische Verbindungen (VOCs)	- 19 -
2.3.1	Mobile VOC-Sammeleinheit.....	- 20 -
2.3.2	Mobiles Closed-Loop VOC-Sammelsystem.....	- 21 -
2.3.3	Labor Closed-Loop VOC-Sammelsystem	- 23 -
2.4	VOC-Emission an befallenen Fichten	- 24 -
2.4.1	Zeitliche Variabilität der VOC-Emission im Tages- und Befallsverlauf.....	- 24 -
2.4.2	Zeitliche Variabilität der VOC-Emission im Befallsverlauf in Abhängigkeit zur Besiedlungsdichte	- 26 -
2.4.3	Zeitliche Variabilität der VOC-Emission im Befallsverlauf unter Laborbedingungen.....	- 28 -
2.5	Tracheale VOC-Emission.....	- 30 -
2.5.1	Tracheale Emission von cis-Verbenol und (-)-Verbenon.....	- 30 -
2.5.2	Pheromonproduktion toter Käfer	- 32 -
2.5.3	Attraktivität von Buchdruckern, die mit (-)- α -Pinen inkubiert wurden	- 32 -
2.5.4	Einfluss der Käferdichte auf die tracheale Emission von VOCs.....	- 35 -
2.6	Genetische Untersuchung zur Variabilität der Emission von cis-Verbenol und (-)-Verbenon	- 36 -
2.7	Gaschromatographische Analysen	- 38 -
2.7.1	Thermodesorptions-Gaschromatographie-Massenspektrometrie.....	- 38 -
2.7.2	Flüssiginjektions-Gaschromatographie-Massenspektrometrie	- 41 -
2.8	Statistik	- 42 -
2.8.1	Statistische Tests	- 42 -
3	Ergebnisse:	- 45 -
3.1	VOC-Emission an befallenen Fichten	- 45 -
3.1.1	Zeitliche Variabilität der VOC-Emission im Tages- und Befallsverlauf.....	- 45 -
3.1.2	Zeitliche Variabilität der VOC-Emission im Befallsverlauf in Abhängigkeit zur Besiedlungsdichte	- 53 -

3.1.3	Zeitliche Variabilität der VOC-Emission im Befallsverlauf unter Laborbedingungen.....	- 61 -
3.2	Tracheale VOC-Emission.....	- 64 -
3.2.1	Tracheale Emission von cis-Verbenol und (-)-Verbenon.....	- 64 -
3.2.2	Pheromonproduktion toter Käfer	- 71 -
3.2.3	Attraktivität von Buchdruckern, die mit (-)- α -Pinen inkubiert wurden	- 72 -
3.2.4	Einfluss der Käferdichte auf die tracheale Emission von VOCs.....	- 74 -
3.3	Genetische Untersuchung zur Variabilität emittierter VOCs	- 81 -
4	Diskussion:	- 84 -
4.1	VOC-Emission an befallenen Fichten	- 84 -
4.1.1	(-)- α -Pinen-Emission.....	- 85 -
4.1.2	Cis-Verbenol-Emission	- 87 -
4.1.3	(-)-Verbenon-Emission.....	- 90 -
4.1.4	Schlussfolgerung zur VOC-Emission an befallenen Fichten.....	- 91 -
4.2	Tracheale VOC-Emission.....	- 93 -
4.2.1	Tracheale Emission von cis-Verbenol und (-)-Verbenon.....	- 94 -
4.2.2	Attraktivität von Buchdruckern, die mit (-)- α -Pinen inkubiert wurden	- 98 -
4.2.3	Einfluss der Käferdichte auf die tracheale Emission von VOCs.....	- 99 -
4.2.4	Schlussfolgerung zur trachealen VOC-Emission.....	- 100 -
5	Zusammenfassung:	- 102 -
6	Summary:	- 104 -
7	Danksagung:	- 106 -
8	Literaturverzeichnis:.....	- 108 -
9	Anhang:	- 118 -
9.1	Anhang zur Genetische Untersuchung zur Variabilität emittierter cis-Verbenolmengen	- 118 -
9.1.1	Homogenisierungspuffer	- 118 -
9.1.2	Trennsystem, Enzymsystem und Trennbedingungen.....	- 118 -
9.1.3	System, Elektrodenpuffer und Gelpuffer	- 118 -
9.1.4	System und Gelrezepte.....	- 119 -
9.1.5	Puffer zur Färbung	- 119 -
9.1.6	Färberezepte	- 119 -

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: Windwürfe am Lackenberg und Sandel im Jahre 2007	- 12 -
Abb. 2: Windwürfe am Lackenberg und Sandel im Jahre 2009.	- 12 -
Abb. 3: Versuchsfläche Geißberg im Nationalpark Bayerischer Wald.....	- 16 -
Abb. 4: Besiedlungsbox für den Zuchtansatz.....	- 17 -
Abb. 5: Schlupfvektor mit abnehmbarer Fangflasche	- 18 -
Abb. 6: Männliches Kopulationsorgan (Foto: Schachtler).....	- 19 -
Abb. 7: Adsorptionsröhrchen ORBO 402 TA.....	- 20 -
Abb. 8: Mobile VOC-Sammeleinheit (Foto: Steinbrecher)	- 21 -
Abb. 9: Teleskopmast der mobilen VOC-Sammeleinheit.....	- 21 -
Abb. 10: Mobiles Closed-Loop VOC-Sammelsystem.....	- 22 -
Abb. 11: Verbindungsstücke zur Integration der Adsorptionsröhrchen.....	- 22 -
Abb. 12: Membranpumpen- und Akkueinheit (Foto: Ruber)	- 23 -
Abb. 13: Labor Closed-Loop VOC-Sammelsystem	- 23 -
Abb. 14: Lineare Beziehung von Tagesmittel Lufttemperatur und Kambialtemperatur	- 26 -
Abb. 15: Einbohrhilfen und Eppendorf GefäÙe als Verschluss	- 27 -
Abb. 16: Unter- und Oberseite eines Rindensandwiches	- 29 -
Abb. 17: Mobiles Closed-Loop VOC-Sammelsystem mit Probenahmebox.....	- 30 -
Abb. 18: Inkubationsröhrchen mit einem Volumen von 12ml.....	- 31 -
Abb. 19: Y-Röhr.....	- 33 -
Abb. 20: Statisches Olfaktometer.....	- 34 -
Abb. 21: Thermodesorptions-Gaschromatographie-Massenspektrometrie System.....	- 39 -
Abb. 22: Beladungssystem für internem Standard.....	- 40 -
Abb. 23: Flüssiginjektions-Gaschromatographie-Massenspektrometrie System.....	- 42 -
Abb. 24: Emittierte VOCs (in ng/l) im Vergleich - Vormittag und Nachmittag.....	- 46 -
Abb. 25: Zeitlicher Verlauf emittierter VOCs (in ng/l) am Vormittag	- 48 -
Abb. 26: Zeitlicher Verlauf emittierter VOCs (in ng/l) am Nachmittag	- 48 -
Abb. 27: Verhältnis von (-)-Verbenon / cis-Verbenol am Vormittag und Nachmittag	- 49 -
Abb. 28: Bohrlochzahl je Probenahmetag.....	- 50 -
Abb. 29: Lineare Regression von „Tage nach Befall“ und cis-Verbenol am Vormittag	- 51 -
Abb. 30: Lineare Regression von „Tage nach Befall“ und cis-Verbenol am Nachmittag..	- 51 -
Abb. 31: Verhältnis von (-)-Verbenon / cis-Verbenol bei schwachem und starkem Befall	- 55 -
Abb. 32: Zeitlicher Verlauf emittierter VOCs (in ng/min) schwach befallene Fichten	- 56 -
Abb. 33: Zeitlicher Verlauf emittierter VOCs (in ng/min) stark befallene Fichten.....	- 57 -

Abb. 34: Lineare Regression von „Tage nach Befall“ und cis-Verbenol - starker Befall ..	- 58 -
Abb. 35: Zeitlicher Verlauf gemessener (-)- α -Pinenkonzentrationen aus Baststanzen	- 59 -
Abb. 36: Zeitlicher Verlauf emittierter VOCs (in ng/min) aus Sandwiches	- 62 -
Abb. 37: Quadratische Regression von „Tage nach Befall“ und cis-Verbenol.....	- 63 -
Abb. 38: Vergleich der Anzahl an Individuen - cis-Verbenol-Exhalation.....	- 65 -
Abb. 39: Vergleich der Anzahl an Individuen - (-)-Verbenon-Exhalation	- 66 -
Abb. 40: Vergleich der Anzahl an Individuen - cis-Verbenol-Produktion	- 67 -
Abb. 41: Vergleich der Anzahl an Individuen - (-)-Verbenon Produktion	- 67 -
Abb. 42: Vergleich exhalierter Mengen an cis-Verbenol.....	- 68 -
Abb. 43: Vergleich exhalierter Mengen an (-)-Verbenon	- 69 -
Abb. 44: Vergleich produzierter Mengen an cis-Verbenol	- 70 -
Abb. 45: Vergleich produzierter Mengen an (-)-Verbenon.....	- 71 -
Abb. 46: Attraktivität von Lockkäferkollektiven - Y-Rohr	- 73 -
Abb. 47: Attraktivität von Lockkäferkollektiven - statisches Olfaktometer	- 74 -
Abb. 48: Exhalierete (-)-Verbenonmengen / cis-Verbenolmengen nach Inkubation von Buchdruckern in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre bei drei Käferdichten	- 76 -
Abb. 49: Exhalierete cis-Verbenolmengen nach Inkubation von Buchdruckern in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre bei drei Käferdichten	- 77 -
Abb. 50: Exhalierete (-)-Verbenonmengen nach Inkubation von Buchdruckern in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre bei drei Käferdichten	- 78 -
Abb. 51: Produzierte (-)-Verbenonmengen / cis-Verbenolmengen nach Inkubation von Buchdruckern in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre bei drei Käferdichten	- 79 -
Abb. 52: Produzierte cis-Verbenolmengen nach Inkubation von Buchdruckern in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre bei drei Käferdichten	- 80 -
Abb. 53: Produzierte (-)-Verbenonmengen nach Inkubation von Buchdruckern in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre bei drei Käferdichten	- 81 -
Abb. 54: Mengen an cis-Verbenol und (-)-Verbenon in Extrakten inkubierter Käfer	- 82 -
Abb. 55: In Harz verklebter Käfer	- 94 -
Abb. 56: Mengen an exhaliertem cis-Verbenol (Pionierkäfer)	- 97 -

Tabellenverzeichnis:

Tab. 1: Untersuchte Enzymsysteme (Loci)	- 36 -
Tab. 2: Zielanalyten mit jeweiligen Leitmassen und Retentionszeiten.....	- 40 -
Tab. 3: Mittlere Lufttemperaturen am Vormittag und Nachmittag.....	- 46 -
Tab. 4: Regressionsanalyse bezüglich des Effekts der Faktoren „Tage nach Befall“ und „Kambialtemperatur“ auf die Emission von (-)- α -Pinen, cis-Verbenol und (-)-Verbenon am Vormittag und Nachmittag	- 52 -
Tab. 5: Regressionsanalyse zwischen emittiertem cis-Verbenol und (-)-Verbenon pro Probenahmetag und während des gesamten Probezeitraums zu den Messzeitpunkten am Vormittag und Nachmittag	- 53 -
Tab. 6: Regressionsanalyse bezüglich des Effekts der Faktoren „Tage nach Befall“, „Kambialtemperatur“ und „(-)- α -Pinengehalt im Bast“ auf die Emission von (-)- α -Pinen, cis-Verbenol und (-)-Verbenon jeweils bei schwachem und starkem Befall.....	- 60 -
Tab. 7: Regressionsanalyse zwischen emittiertem cis-Verbenol und (-)-Verbenon pro Probenahmetag und während des gesamten Probezeitraums bei starkem und schwachem Befall	- 61 -
Tab. 8: Regressionsanalyse bezüglich des Effekts des Faktors „Tage nach Befall“ auf die Emission von (-)- α -Pinen, cis-Verbenol und (-)-Verbenon.	- 63 -
Tab. 9: Regressionsanalyse zwischen emittiertem cis-Verbenol und (-)-Verbenon pro Probenahmetag und während des gesamten Probezeitraums unter Laborbedingungen.....	- 64 -
Tab. 10: Existenz der Zielanalyten (-)- α -Pinen, cis-Verbenol und (-)-Verbenon in Hexan-Proben nach Oberflächenwaschung unbehandelter und inkubierter Käfer	- 72 -
Tab. 11: Existenz der Zielanalyten (-)- α -Pinen, cis-Verbenol und (-)-Verbenon in Hexan-Extrakten von unbehandelten und inkubierten Käfern.....	- 72 -
Tab. 12: Darstellung der Unterschiede der genotypischen Ausstattung im Vergleich zwischen wenig, mittel und viel cis-Verbenol produzierenden Käfern	- 83 -
Tab. 13: Darstellung der Unterschiede der genotypischen Ausstattung im Vergleich zwischen wenig, mittel und viel (-)-Verbenon produzierenden Käfern.....	- 83 -

1 Einleitung:

Die Kommunikation zwischen Insektenindividuen der gleichen Art, zwischen unterschiedlichen Insektenarten sowie zwischen Pflanzen und Insekten findet häufig mittels flüchtiger organischer Verbindungen (volatile organic compound(s)-VOCs) statt (Regnier und Law 1968; Blum 1996; Reddy und Guerrero 2004). Dienen diese Kommunikationsstoffe zur Übermittlung von Informationen zwischen Individuen der gleichen Art, werden sie als Pheromone bezeichnet, bei einem Informationsaustausch zwischen verschiedenen Arten als Allelochemikalien. Allelochemikalien werden weiterhin unterteilt, je nachdem, ob der Vorteil des Informationsaustausches bei dem Sender (Allomone), bei dem Empfänger (Kairomone) oder bei beiden liegt (Synomone) (Bergstrom 2007). Durch chemische Kommunikationsstoffe werden beispielsweise die Bereitschaft zur Paarung (Bierl *et al.* 1970; Harborne 1993; Tokro *et al.* 1993), die Lage und Qualität einer Nahrungsquelle oder die Nestzugehörigkeit angezeigt (Hölldobler und Wilson 1990; Breed 1998) sowie Fraßfeinde abgeschreckt (Eisner *et al.* 2000; Baier *et al.* 2002; Lehmborg *et al.* 2008).

Für die Produktion der chemischen Kommunikationsstoffe kommen verschiedene Verfahren in Betracht. So werden sie *de novo* produziert, aus mit der Nahrung verzehrten Vorstufen synthetisiert oder einfach durch Fraß aufgenommen und gespeichert (Tillman *et al.* 1999; Macias *et al.* 2007; Blomquist *et al.* 2010).

Auch der Buchdrucker *Ips typographus* (Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae) verfügt über ein effizientes chemisches Kommunikationssystem, welches die Aggregation der Käfer steuert. Es besteht aus mehreren Komponenten, die entweder eine attraktive Wirkung auf Artgenossen haben und so zu einer räumlichen Konzentration führen oder repellent auf Artgenossen wirken. Letztere verhindern eine übermäßige Besiedlung einer Ressource und wirken so einer drohenden Konkurrenzsituation entgegen.

Das Bouquet des Aggregationspheromons des Buchdruckers besteht hauptsächlich aus drei Substanzen: den beiden Monoterpenen cis-Verbenol und Ipsdienol sowie dem hydroxylierten Isoprenderivat 2-Methyl-3-buten-2-ol (Vité *et al.* 1972; Bakke 1976; Bakke *et al.* 1977). Für die Synthese von cis-Verbenol benötigt der Käfer als Vorstufe das fichtenbürtige Terpen (-)- α -Pinen (Renwick *et al.* 1976; Klimetzek und Francke 1980; Blomquist *et al.* 2010), welches anschließend zu cis-Verbenol oxidiert wird. Hier geht man davon aus, dass Enzyme aus der Cytochrom P450 Familie diese Oxidationsreaktion katalysieren (White *et al.* 1979; White *et al.* 1980; Huber *et al.* 2007; Blomquist *et al.* 2010). (-)- α -Pinen kommt sowohl als Hauptkomponente im Harz der Fichte (Erbilgin *et al.* 2007) als auch in der Waldluft vor

Einleitung:

(Janson 1993). Für den Buchdrucker ist (-)- α -Pinen ab bestimmten Konzentrationen giftig. Die Oxidation zu cis-Verbenol kann somit auch als Entgiftungsprozess verstanden werden (Bohlander 1996). Die beiden anderen Komponenten können *de novo* über den Mevalonatweg synthetisiert werden. Hierbei dient Isopentenylidiphosphat als Vorstufe sowohl für 2-Methyl-3-buten-2-ol als auch für Ipsdienol, das via Myrcen gebildet wird (Lanne *et al.* 1989; Blomquist *et al.* 2010). Cis-Verbenol und 2-Methyl-3-buten-2-ol stellen die Hauptkomponenten des Aggregationspheromons dar (Bakke *et al.* 1977; Schlyter *et al.* 1987b). Hierbei gilt cis-Verbenol als fernwirksamer Lockstoff und 2-Methyl-3-buten-2-ol stimuliert die Landung der Artgenossen am Wirt. Die attraktive Wirkung von Ipsdienol wurde hingegen als weniger effektiv erkannt. Schlyter und Kollegen (1987a) zeigten, dass Ipsdienol die Attraktivität von Pheromonködern, welche bereits cis-Verbenol und 2-Methyl-3-buten-2-ol enthielten, nicht erhöhte.

Aggregation beinhaltet im Falle von Borkenkäfern stets das Risiko einer Konkurrenz um Raum und Nahrung. Zur Vermeidung von Konkurrenzsituationen am Wirt werden von den Käfern (-)-Verbenon und Ipsenol, Substanzen mit repellenter Wirkung, abgegeben (Bakke 1981; Schlyter *et al.* 1989; Byers 1993; Andersson *et al.* 2009). Im Vergleich zu Ipsenol, das sich wie Ipsdienol aus Myrcen ableitet (Blomquist *et al.* 2010), wird angenommen, dass (-)-Verbenon eine stärkere Wirksamkeit bei der Regulierung der Aggregation hat. Schlyter und Kollegen (1989) begründen diese Vermutung dadurch, dass (-)-Verbenon in höheren Konzentrationen und während eines Befallsverlaufs früher emittiert wird. (-)-Verbenon ist ein Oxidationsprodukt von cis-Verbenol. Für die Synthese von (-)-Verbenon werden in der Literatur zwei Wege beschrieben. Leufvén *et al.* (1984) zeigten, dass Hefen, die zuvor aus Buchdruckern isoliert wurden, in der Lage waren, aus cis-Verbenol (-)-Verbenon zu synthetisieren. Die Synthese von (-)-Verbenon durch Hefen wird zusätzlich von Hunt (1990) allerdings für *Dendroctonus ponderosae* beschrieben. Neben der Synthese von (-)-Verbenon durch Mikroorganismen soll (-)-Verbenon auch durch Autoxidation entstehen (Hunt *et al.* 1989; Niemeyer *et al.* 1995).

Noch nicht vollständig geklärt ist, in welchen Organen bzw. an welchem Ort die Pheromonsynthese stattfindet. Durch Studien an *Ips paraconfusus* vermuten Ivarsson und Kollegen (1998) den Bereich des Metathorax als Ort der Pheromonsynthese, wohingegen Diaz *et al.* (2000) durch Analysen an *Dendroctonus frontalis* und Nardi *et al.* (2002), die Untersuchungen an *Dendroctonus jeffreyi* und *Ips pini* durchführten, den Mitteldarm als Syntheseort annehmen. (-)-Verbenon hingegen soll im Enddarm von Borkenkäfern synthetisiert werden, aber im Falle einer Autoxidation von cis-Verbenol wäre eine Bildung

Einleitung:

außerhalb der Käfer möglich (Niemeyer *et al.* 1995). Die Fähigkeit von Borkenkäfern, Pheromone zu synthetisieren wird in der Literatur als individuell verschieden beschrieben. Nach Birgersson *et al.* (1988) produzierten relativ wenige Versuchstiere große Mengen an Pheromon und die Mehrzahl nur geringe. Diese individuellen Unterschiede bezüglich der Pheromonsynthese können durch äußere Faktoren, wie etwa die Verfügbarkeit von Vorstufen, beeinflusst werden (Byers 1981; Birgersson 1989). Auch das Geschlecht der Käfer spielt eine Rolle: Männliche Buchdrucker produzieren mehr Pheromon als Weibchen (Klimetzek und Francke 1980). Weiterhin kann der Hormonstatus der Käfer die Pheromonproduktion beeinflussen. Hierbei scheint Juvenilhormon eine besondere Bedeutung zu haben (Hughes und Renwick 1977; Vanderwel 1994; Tittiger *et al.* 1999; Bearfield *et al.* 2009; Blomquist *et al.* 2010). Beispielsweise stellten Tittiger und Kollegen (1999) in ihrer Arbeit fest, dass eine Behandlung von Käfern der Art *Ips paraconfusus* mit Juvenilhormon III die Pheromonproduktion bei männlichen Individuen steigerte. Hughes und Renwick (1977) beobachteten zusätzlich eine Steigerung der Umsetzung von (-)- α -Pinen zu cis-Verbenol.

Die Freisetzung von Pheromonen findet, so wie bislang angenommen, am Wirtsbaum des Buchdruckers statt (Wood 1982). Hier befällt der Buchdrucker, als prinzipiell sekundärer Schädling, geschwächte Fichten, deren Vitalitätsverlust in vielfältiger Weise ausgelöst werden kann, jedoch stets in enger Verbindung zum Wasserhaushalt zu sehen ist. Wesentliche Stressphänomene sind Dürre und Staunässe sowie Windbruch oder Windwurf.

Die Wirtsbaumbesiedlung findet beim Buchdrucker durch einen zweistufigen Prozess statt. In einem ersten Schritt werden geeignete Bäume ausgewählt. Hierbei sind die ersten Besiedler eines Wirtsbaumes männlichen Geschlechts, die aufgrund des frühen Zeitpunktes der Besiedlung als Pionierkäfer bezeichnet werden.

Bei diesem ersten Schritt ist davon auszugehen, dass die Pionierkäfer durch Wirtssubstanzen angelockt werden. Dieser Vorgang wird als Primärattraktion bezeichnet. In verschiedenen Untersuchungen konnten festgestellt werden, dass Wirtssubstanzen attraktiv auf Käfer wirkten (Wood 1982). So beschreiben Reddemann und Schopf (1996) einen Anstieg der Anflugrate von Buchdruckern in pheromonbeköderten Flugbarrierefallen bei einem Duftbouquet aus (-)- α -Pinen und (+)-Limonen. In Untersuchungen mit liegenden Bäumen bzw. Stammstücken, welche als sogenannte Fangbäume Käfer anlocken sollten, konnten ebenfalls mit *I. typographus* aber auch mit *Dendroctonus pseudotsugae* attraktive Wirkungen festgestellt werden (Rudinsky 1966; Rudinsky 1971; Führer *et al.* 1991; Lindelöw und Risberg 1992). Somit wird davon ausgegangen, dass Substanzen aus Wirtsbäumen einen

Einleitung:

Einfluss auf deren Attraktivität haben. Es ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, welche Veränderungen des Duftbouquets einer Fichte dem Käfer den Schwächezustand eines potentiellen Wirtes und damit dessen Eignung als Wirtsbaum signalisieren. Informationen über den Schwächezustand des potentiellen Wirtes sind für die erstbesiedelnden Pioniere von zentraler Bedeutung, denn Vitalitätsverlust ist gleichbedeutend mit einer verminderten Wirtsabwehr. Hierzu zählen mechanische Mechanismen wie die Beschaffenheit der Rinde und die Klebrigkeit des Harzes sowie giftige bzw. letale Konzentrationen von Harzkomponenten (Nihoul und Nef 1992; Baier 1996; Rohde 1996; Baier *et al.* 2002; Franceschi 2005).

Mit dem Einbohren der Pionierkäfer wird eine zweite Ebene der Kommunikation eingeleitet, die sogenannte Sekundärattraktion. Hierbei nagen die Pioniere nach dem Einbohren im Bast einen Begattungsraum (Rammelkammer) (Wermelinger 2004). Das hier während dem Fraß aufgenommene (-)- α -Pinen wird, wie oben beschrieben, zu cis-Verbenol oxidiert, einer Hauptkomponente des Aggregationspheromons (Renwick *et al.* 1976). Simultan synthetisieren die Käfer 2-Methyl-3-buten-2-ol, die zweite wichtige Komponente des Aggregationspheromons. Beide Substanzen werden mit dem Kot ausgeschieden (Vité und Francke 1976; Byers 1989), was zu einer Attraktion von Artgenossen führt. Aggregationspheromone, so auch die des Buchdruckers, wirken anziehend auf beide Geschlechter. Das bedeutet, dass sich zum einen Geschlechtspartner finden und zum anderen neu hinzukommende Männchen ihrerseits Begattungskammern anlegen und dadurch das Pheromonsignal sowie den Zuflug verstärken. Bezüglich seiner attraktiven Wirkung ist das Aggregationspheromon dem Kairomon der Wirtsbäume weit überlegen (Wermelinger 2004). Birgersson und Kollegen zeigten, dass die Wirkung des Aggregationspheromons innerhalb der ersten Woche eines Befalls ihren Höhepunkt erreicht (1984; 1989). In der Studie aus dem Jahr 1984 extrahierten sie den Darmtrakt von Käfern aus unterschiedlichen Stadien der Besiedlung des Wirtes (z.B. laufende Käfer auf der Stammoberfläche oder Käfer unter der Rinde während der Anlage des Brutsystems) und stellten fest, dass die Mengen an attraktiv wirkenden Substanzen (2-Methyl-3-buten-2-ol und cis-Verbenol) vor der Ankunft der Weibchen am höchsten waren. In der Untersuchung aus dem Jahr 1989 wurden emittierte flüchtige Substanzen an Bohrlöchern innerhalb der ersten Befallswoche gesammelt. Hier stiegen die Mengen an freigesetztem cis-Verbenol bis zum zweiten Tag an und sanken im Mittel in der Folgezeit.

Im weiteren Befallsverlauf folgt anschließend an die Sekundärattraktion die Anlage der Brutsysteme in der Bastsschicht des Wirtes. Hierzu nagt das Weibchen im Bast einen

Einleitung:

sogenannten Muttergang parallel zur Faserrichtung und legt an dessen Rand Eier ab, aus denen sich Larven entwickeln, deren horizontale Fraßgänge in einer Puppenwiege enden. Die Entwicklungsdauer vom Ei bis zum Puppenstadium ist temperaturabhängig. Nach Wermelinger und Seifert (1998) dauert die Entwicklung vom Ei bis zum Puppenstadium bei 15°C 48,9 Tage und verkürzt sich bei 30°C auf 17,3 Tage. Abhängig von Temperatur und Jahresgang bzw. der Photoperiode, fliegen die sich aus den Puppen entwickelnden Käfer nach einem Reifungsfraß aus oder überwintern im Stamm (Dolezal und Sehnal 2007). So kann es bei optimale Temperaturbedingungen in Kombination mit dem Einfluss der Photoperiode zu mehreren Generationen pro Jahr kommen (Multivoltinismus). In der Regel sind das zwei Generationen. Im bivoltinen Zyklus begründen die überwinterten Käfer im Frühjahr eine F1-Generation, die nach einer Sommerdispersion eine überwinternde Folgegeneration (F2) etabliert (Harding und Ravn 1985; Faccoli 2009; Jonsson *et al.* 2011).

Der Entwicklungszyklus bindet den Buchdrucker eng an seinen Wirt, die Fichte. Mit Ausnahme der kurzen Dispersionsphase befinden sich alle Entwicklungsstadien in einem unmittelbaren stofflichen Kontakt mit den Inhaltsstoffen der Fichtenrinde. Interessant ist in diesem Zusammenhang das dominante Monoterpen (-)- α -Pinen (Borgkarlson *et al.* 1993), in seiner ambivalenten Bedeutung als Abwehrsubstanz der Fichte und gleichzeitig als Vorstufe von Pheromonkomponenten des Buchdruckers. Bisherige Untersuchungen fokussieren das initiale Stadium der Wirtsbaumbesiedlung in Form von Käferextrakten (Klimetzek und Francke 1980; Birgersson *et al.* 1984; Bohlander 1996) bzw. der Gasanalyse unmittelbar nach dem Einbohren (Birgersson und Bergström 1989; Pureswaran und Sullivan 2012). Die Arbeiten stellen unter anderem eine enge Beziehung zwischen dem fichtenbürtigen (-)- α -Pinen und den oxidierten Folgeprodukten her.

Über Präsenz bzw. Abwesenheit der Oxidationsprodukte des (-)- α -Pinsens im weiteren Befallsverlauf gibt es noch keine Informationen. Aufgrund der notwendigen Entgiftung des für die Käfer giftigen (-)- α -Pinsens, welches auch von Larven und Jungkäfern während des Fraßes aufgenommen wird, sollte das hieraus resultierende cis-Verbenol auch im weiteren Befallsverlauf emittiert werden. Da (-)-Verbenon das Oxidationsprodukt von cis-Verbenol ist, könnte ebenso eine Emission von (-)-Verbenon stattfinden.

Üblicherweise kommen geschwächte Fichten als potentielle Wirtsbäume eher selten und unregelmäßig verteilt in Wäldern vor. Dispergierende Käfer müssen sie finden und sind dabei oft erfolglos, mit entsprechenden Konsequenzen für die Populationsdichte. Als typischer r-Strategie profitiert der Buchdrucker aber von Katastrophen, vor allem von Dürreperioden

Einleitung:

(Rouault *et al.* 2006; Gugerli *et al.* 2008) und Sturmwürfen (Schröter *et al.* 1998; Mayer und Schindler 2002; Fink *et al.* 2009; Schroeder 2010; Klaus *et al.* 2011), die ihm großflächig Brutmaterial bereitstellen. Diese Ressourcen sind aufgrund ihrer räumlichen Auffälligkeit leicht zu entdecken (Schroeder 2010). Die Wirtsabwehr ist minimal und wegen des umfangreichen Brutmaterials bleibt eine Konkurrenz um Nahrung und Raum zwischen den Larven gering. Typisch für Sturmwürfe ist ein partieller Wurzelkontakt der Bäume, wodurch diese nur verzögert austrocknen und somit noch für eine zweite oder dritte Brutwelle zur Verfügung stehen. In geworfenen Bäumen wurde im Vergleich zu stehenden Bäumen eine höhere Fruchtbarkeit der Weibchen festgestellt (Komonen *et al.* 2011). Hinzu kommt die intensive Sonneneinstrahlung auf Windwurfflächen, die aufgrund der resultierenden Erwärmung zu einer Beschleunigung des Entwicklungszykluses des Buchdruckers führt. Diese zusammenwirkenden Faktoren lassen die Populationsdichte des Buchdruckers innerhalb kurzer Zeit auf ein epidemisches Niveau ansteigen. Die Kriterien dafür, eine lokale Buchdruckerpopulation als epidemisch zu bezeichnen, orientieren sich an der Aktivitätsdichte, die mittels Pheromonfallenfängen ermittelt werden. Der Schwellenwert hierfür schwankt zwischen 8000 bis 15000 Käfern pro Pheromonfalle und Jahr (Weslien 1992; Lindelöw und Schroeder 2001; Faccoli und Stergulc 2004; Faccoli und Bernardinelli 2011). Die Erfahrungen der Forstpraktiker zeigen, dass unter solchen Bedingungen gesunde und vitale stehende Fichten ebenfalls befallen werden (Wichmann und Ravn 2001; Forster *et al.* 2003; Eriksson *et al.* 2005; Gilbert *et al.* 2005). Unter solchen Bedingungen vollführt der Buchdrucker einen Wandel vom Sekundärschädling zum Primärschädling, unter maßgeblicher Beteiligung der Pheromonlenkung (Mulock und Christiansen 1986).

Solch eine Massenvermehrung mit anschließendem Stehendbefall konnte zum Beispiel am Lackenberg und Sandel im Nationalpark Bayerischer Wald beobachtet werden. Hier entstanden durch den Sturm Kyrill im Jahre 2007 zwei große Windwürfe mit einer Fläche von je 30ha (Abb. 1). In den beiden folgenden Jahren wuchs die Käferpopulation auf den Windwürfen derart an, dass es im Frühjahr 2009 zu einem Massenausflug kam, der einen Stehendbefall in einem die Windwürfe umgebenden Gürtel mit einem Durchmesser von ca. 100m zur Folge hatte (Abb. 2). Die langandauernde Buchdruckerübervermehrung im sogenannten Altpark des Nationalparks Bayerischer Wald, hat die Baumholz-Fichtenfläche von ursprünglich 10700ha im Verlauf von 21 Jahren auf 4800ha reduziert (Kautz *et al.* 2011).

Einleitung:

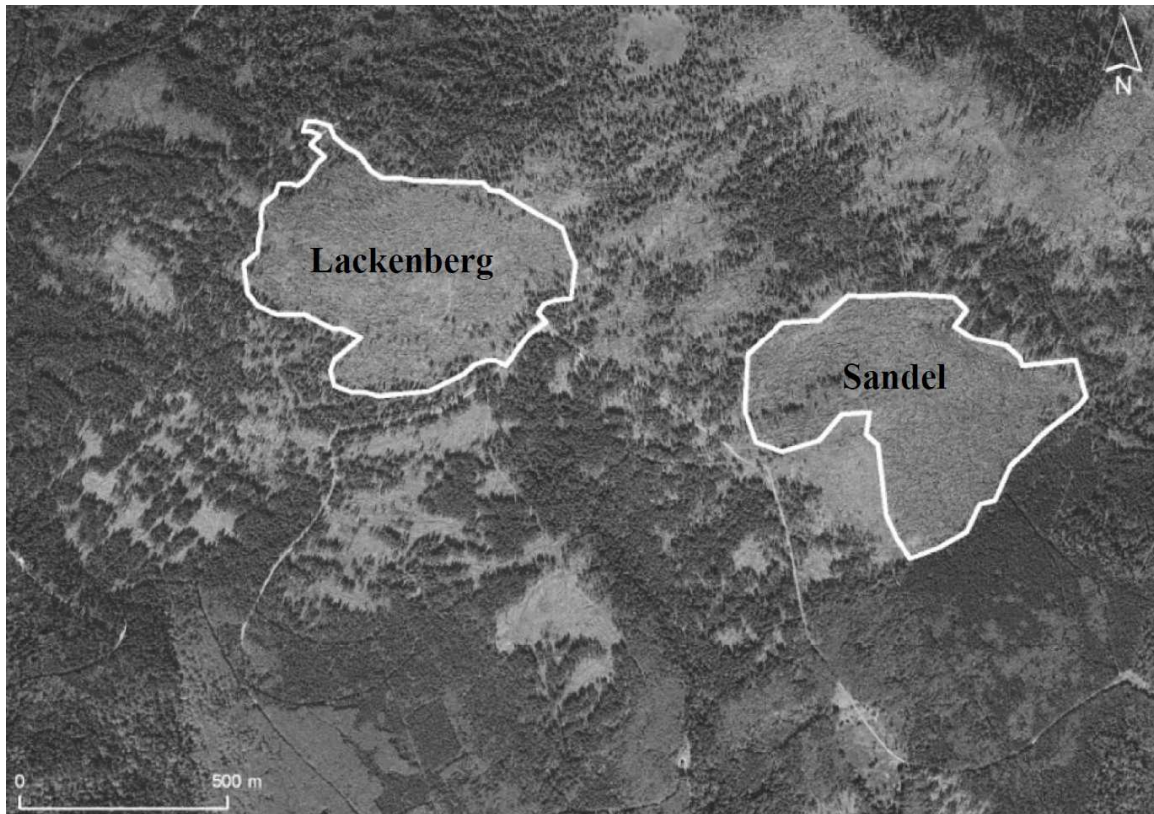


Abb. 1: Durch den Sturm Kyrill im Februar 2007 entstandene Windwürfe am Lackenberg und Sandel im Nationalpark Bayerischer Wald.

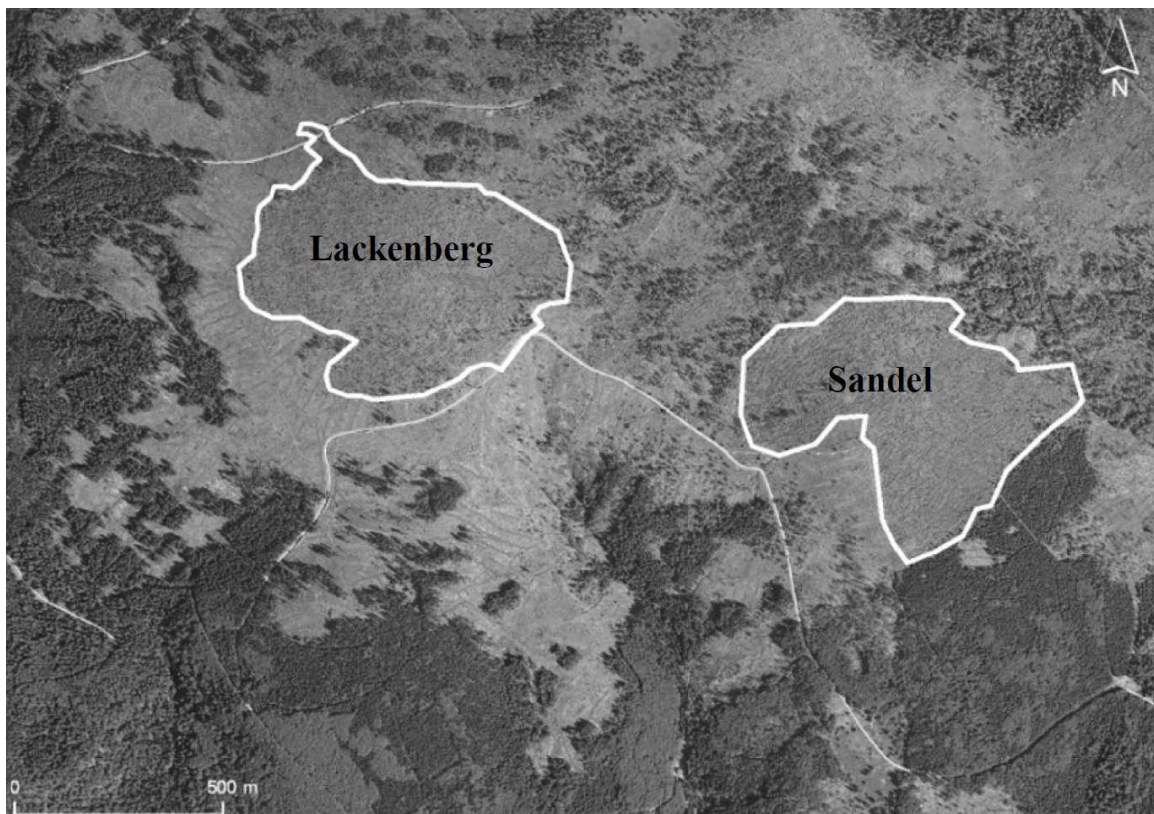


Abb. 2: Windwürfe am Lackenberg und Sandel im Jahre 2009. In einem die Windwürfe umgebenden Gürtel von ca. 100m Durchmesser wurden alle stehendbefallene Fichten entfernt.

Einleitung:

Die Ursachen dafür, wann und wie der Übergang von einem latenten durch Sekundärbefall gekennzeichneten Zustand hin zu einem Primärbefall vollzogen wird, sind nur unvollständig verstanden. Es ist noch nicht gänzlich geklärt, auf welche Art und Weise der Buchdrucker die effektive und voll intakte Wirtsabwehr von stehenden vitalen Bäumen überwinden kann. Hier wird davon ausgegangen, dass durch Massenbefall der Wirt geschwächt wird und dadurch die Wirtsabwehr zusammenbricht, was schließlich eine Besiedlung ermöglicht (Schlyter und Anderbrant 1989). Jedoch würden hier die Käfer, die den Wirt zuerst erreichen, ein hohes Mortalitätsrisiko erfahren, da sie während der initialen Phase des Primärbefalls mit der intakten Wirtsabwehr konfrontiert werden würden. Nur wenn innerhalb kurzer Zeit zahlreiche Einbohrungen stattfinden, besteht eine Chance die Harzabwehr der Fichte erfolgreich zu erlahmen.

Eine Möglichkeit eine etwa zeitgleiche Erlahmung der Harzabwehr zu erreichen wäre eine Aggregation von Buchdruckern vor der Besiedlung des Wirtes, mit einem anschließenden etwa zeitgleichen Massenbefall. Voraussetzung hierfür ist eine Attraktion von Artgenossen außerhalb der Brutsysteme, welche über eine tracheale Emission des Aggregationspheromons des Buchdruckers erreicht werden könnte. Eine tracheale Aufnahme von (-)- α -Pinen, sowie die anschließende Synthese zu cis-Verbenol konnte bereits nachgewiesen werden (Klimetzek und Francke 1980; Reddemann 1993; Bohlander 1996).

Zunächst interessierte in der vorliegenden Arbeit die Variation der Emission der cis-Verbenol-Vorstufe (-)- α -Pinen, dem attraktiv wirkenden cis-Verbenol und dem repellent wirkenden (-)-Verbenon während des gesamten Befallsverlaufes. Weiterhin sollte der Effekt von emissionsbeeinflussenden Faktoren wie Temperatur, Tagesgang, Besiedlungsdichte und die vorhandene Menge an Vorstufe überprüft werden. Hinsichtlich der (-)-Verbenon-Emission interessierte, ob zwischen der Emission von cis-Verbenol und (-)-Verbenon eine Korrelation gefunden werden kann.

Weiterhin sollte in dieser Arbeit die Möglichkeit der trachealen Emission von cis-Verbenol nach trachealer Aufnahme der Vorstufe (-)- α -Pinen überprüft werden. Denn diese Form der cis-Verbenol Freisetzung gilt als Voraussetzung für eine Aggregation von Buchdruckern vor der Besiedlung des Wirtes. Die chemische Verwandtschaft von cis-Verbenol und (-)-Verbenon legte nahe die tracheale Emission von (-)-Verbenon ebenfalls zu prüfen.

Einleitung:

Als zweite Voraussetzung einer Aggregation vor der Besiedlung des Wirtes sollten die tracheal emittierten VOCs eine attraktive Wirkung auf Artgenossen ausüben. In Biotests wurde dieser Frage nachgegangen.

Ein Massenangriff auf einen Wirt erleichtert die Überwindung der Wirtsabwehrmechanismen. Ist die Käferdichte an einem Wirt jedoch zu hoch, kann es zu Brutplatzmangel im Wirt kommen (Anderbrant *et al.* 1985). Ab einer Muttergangdichte von mehr als 500 Muttergängen pro m² sinkt der Bruterfolg erheblich (Schopf und Köhler 1995). Um solch eine Konkurrenzsituation zu vermeiden werden von den Käfern repellente Substanzen wie (-)-Verbenon abgegeben (Schlyter *et al.* 1989), die eine weitere Attraktion von Artgenossen verhindern. Bei einer Aggregation von Artgenossen nach trachealer Abgabe von cis-Verbenol, könnte es zu einer übermäßigen Verdichtung von Käfern außerhalb des Wirtes kommen. Hier würden die Käfer nicht nur anhand olfaktorischer Signale miteinander interagieren, sondern auch taktil oder visuell. Diese Signale könnten zur Informationsübermittlung der Käferdichte vor dem Wirtsbefall genutzt werden, bei hoher Käferdichte eine tracheale Abgabe von (-)-Verbenon auslösen und somit eine Reduktion der Attraktion bewirken. Unklar ist, ob die Emission von (-)-Verbenon bei einer Erhöhung der Käferdichte gesteigert wird. In Laborversuchen sollte dies untersucht werden.

Die Produktion von cis-Verbenol und (-)-Verbenon variiert innerhalb einer Population stark. Es gibt viele Individuen, die eine nur geringe Produktion der VOCs haben, und wenige Individuen, die viel VOCs produzieren. Neben äußerlichen Faktoren, wie die vorherrschenden Voraussetzungen während der Entwicklung der Käfer oder Vorhandensein von Vorstufen, können auch genetische Faktoren ursächlich für eine unterschiedliche Pheromonproduktion sein. Somit könnten mittels genetischer Methoden Individuen identifiziert werden, die sich bezüglich ihrer Pheromonproduktion von anderen unterscheiden. Mittels Isoenzymanalyse wurde dieser Hypothese nachgegangen.

2 Material und Methoden:

2.1 Untersuchungsgebiet der Freilandversuche

Die Freilandversuche wurden im Nationalpark Bayerischer Wald auf der Versuchsfläche Geißberg durchgeführt. Der Nationalpark liegt im deutschen Teil des Böhmerwalds an der deutsch-tschechischen Grenze. Er wurde im Jahre 1970 gegründet und hat eine Größe von 24235ha. Das Gebiet des Nationalparks ist durch submontane und hochmontane Höhenstufen zwischen 650m bis 1420m über NN charakterisiert (Bässler *et al.* 2009). 98% seiner Fläche sind von Wald bedeckt (Elling 1987). Das Klima wird im Sommer durch atlantische Einflüsse mit häufigen Niederschlägen und im Winter durch kontinentale Einflüsse mit lang andauernden Schneeperioden geprägt (Rall 1995). Abhängig von der Höhenlage beträgt der jährliche Niederschlag 1200mm bis 1800mm und die mittlere Jahreslufttemperatur reicht von 5,1°C in den Tallagen bis zu 3,8°C in den Hochlagen (Noack 1979; Bässler 2004). Die Versuchsfläche Geißberg befindet sich in der Nähe der Ortschaft Klingenbrunn (48°55'58,27''N 13°20'38,32''O, ca. 750m über NN) in der sogenannten Rachel-Lusen-Region. Die Vegetation des Untersuchungsgebiets wird bis auf kleinere Bereiche, in denen Buche (*Fagus sylvatica*) wächst, von Fichte (*Picea abies*) dominiert. Borkenkäferbefall an stehenden Fichten ist auf der Versuchsfläche seit 2005 bekannt und wurde im Rahmen des Projektes „Analyse der Borkenkäfersituation in den Nationalparks Bayerischer Wald und Berchtesgaden (Borkenkäfer-Dispersion)“ (Dworschak *et al.* 2011) seit 2007 durch Mitarbeiter der Bayerischen Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft aufgezeichnet.

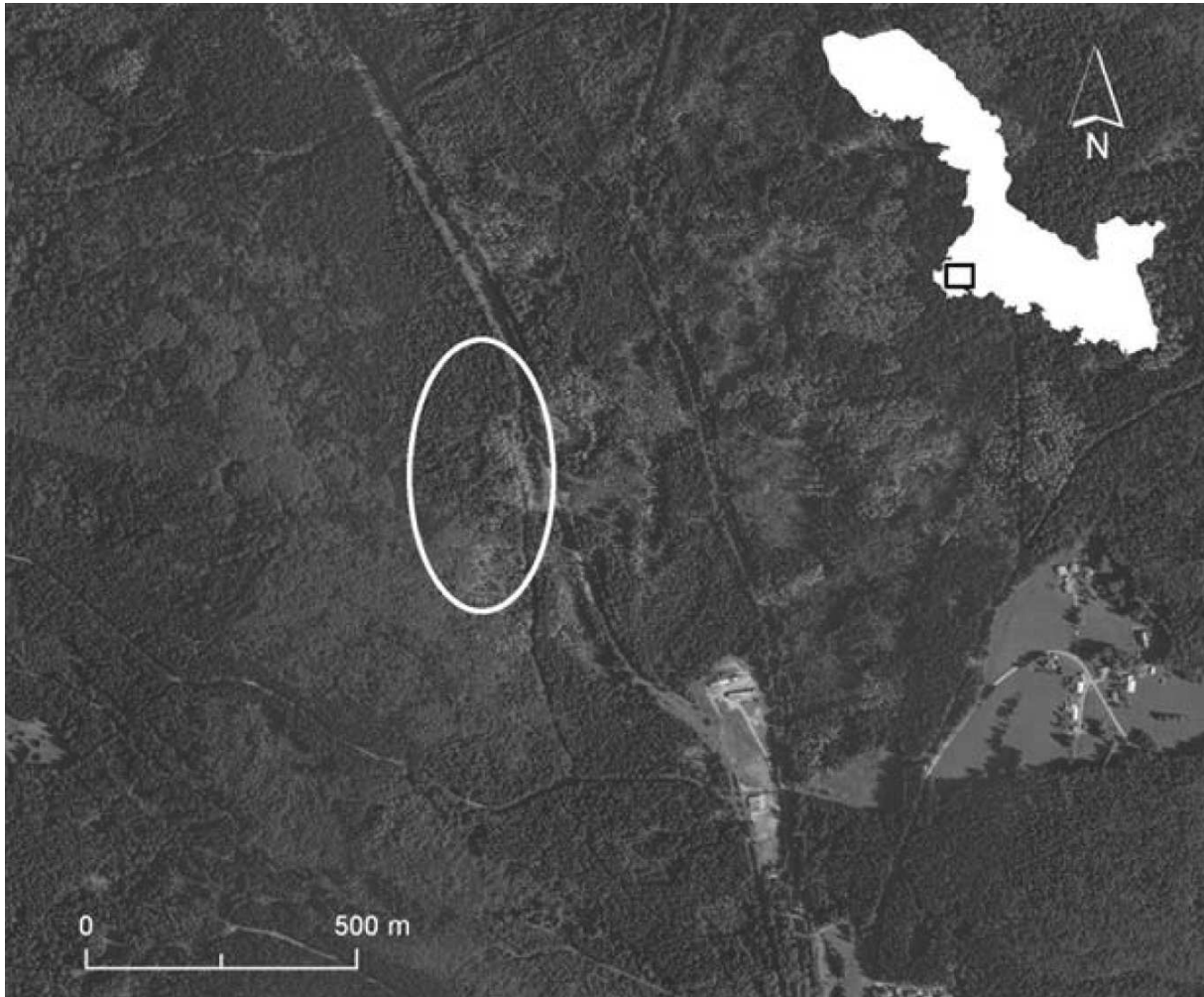


Abb. 3: Versuchsfläche Geißberg (48°55'58,27"N 13°20'38,32"E) im Nationalpark Bayerischer Wald

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Laborzucht

Für alle Laborexperimente wurden Versuchstiere der Art *Ips typographus* aus einer Laborzucht verwendet. Diese wurde Ende 2006 nach der Methodik von Bohlander (1996) aufgebaut. Die Käfer des ersten Zuchtansatzes stammten aus dem Forstbetrieb Freising (Kranzberger Forst; 48°24'N, 11°39'E). Für alle folgenden Zuchtansätze wurden Käfer aus der Laborzucht verwendet. Als Brutmaterial wurden Fichtenstammrollen mit einer Länge von ca. 60cm und einem Durchmesser von 20-35cm verwendet. Die hierzu gefällten Fichten stammten aus dem Kranzberger Forst und entsprachen der Kraft'schen Klasse II. Um eine übermäßige durch Wärme bedingte Austrocknung der Stammrollen zu verhindern, lagerten diese vor der Verwendung zur Zucht in einem Kühlraum bei ca. 4°C. Hier wurde darauf geachtet, dass die zur Zucht verwendeten Stammrollen eine Lagerzeit von sechs Wochen nicht überschritt, da ein Qualitätsverlust durch Austrocknung auch im Kühlraum bei 4°C zu befürchten war. Einen halben Tag vor Zuchtansatz wurden die Stammrollen aus dem

Material und Methoden:

Kühlraum genommen und im Zuchtraum auf Raumtemperatur temperiert. Hiermit sollte eine verminderte Einbohraktivität der Käfer aufgrund einer zu kalten Oberfläche verhindert werden. Zu Beginn eines Zuchtansatzes wurden die Stammrollen in spezielle Besiedlungsboxen aus unbehandelter Spanplatte gelegt. Diese waren 100cm tief und je 40cm breit und hoch. Sowohl auf der Oberseite als auch im Deckel der Boxen waren mit Drahtgaze verschlossene Öffnungen (Abb. 4) zur Belichtung und Ventilation.



Abb. 4: Besiedlungsbox für den Zuchtansatz

Die Besiedlung der Stammrollen fand mit je 40 – 60 Käfern aus der Laborzucht statt. Um einen maximalen Bruterfolg zu erreichen, musste auf eine effektive Verteilung der Brutsysteme auf der Oberfläche der Stammrollen geachtet werden. Hierzu wurde zunächst die Hälfte der Käfer auf der Oberseite der Stammrollen verteilt. Am folgenden Tag wurde mittels Bohrmehlanhäufungen an Bohrlöchern der Einbohrerfolg der Käfer kontrolliert. Anschließend wurden die Stammrollen um 90° gedreht, um so die noch unbesiedelten Seiten der Stammrollen mit den restlichen Käfern zu besiedeln. Bei einer Temperatur von 26°C und Langtagbedingungen mit 16h Hellperiode und 8h Dunkelperiode verblieben die Stammrollen für vier Wochen in den Zuchtboxen. Nach den vier Wochen wurden die Stammrollen in speziellen Schlupfektoren senkrecht aufgehängt. Diese bestanden aus je einer Plexiglasröhre und einem als Deckel dienenden Blumentopfuntersetzer auf der Oberseite, sowie einem Kunststofftrichter auf der Unterseite, der in eine Fangflasche mündete (Abb. 5).



Abb. 5: Schlupfvektor mit abnehmbarer Fangflasche

Ausfliegende Käfer prallten somit an die Innenseiten der Plexiglasröhren und rutschten durch die Trichter in die Fangflaschen. Einmal am Tag wurden die Fangflaschen geleert. Hierzu wurde deren gesamter Inhalt auf ein Sieb gegeben, um die Käfer vom Bohrmehl zu trennen. Anschließend wurden die Käfer in Petrischalen in einem Kühlraum bei 4°C gelagert. Für Laborversuche wurden nur Käfer verwendet, welche nicht länger als 3 Tage in dem Kühlraum lagerten. Käfer, welche für die Laborzucht verwendet wurden, lagerten nicht länger als 4 Wochen im Kühlraum.

2.2.2 Geschlechtsbestimmung

In den meisten Fällen erfolgte die Geschlechtsbestimmung durch Sektion. Hierzu wurden die Käfer nach den jeweiligen Untersuchungen in einem Gefrierschrank bei -20°C abgetötet. Anschließend wurden die Käfer ventral am Übergang von Thorax zu Abdomen mit einer feinen Uhrmacherpinzette geöffnet. Ein Schenkel der Pinzette wurde zwischen dem letzten Beinpaar unter das erste Abdominalsegment geschoben und anschließend das Abdomen aufgeklappt. Als Geschlechtsdifferenzierungsmerkmal diente das Vorhandensein eines Penis (Abb. 6). Dieser konnte durch seine ausgedunkelte Chitinoberfläche unter einem Stereomikroskop (Stemi SV 11, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei 25facher Vergrößerung erkannt werden (Merker 1954). In dem Fall, in dem Käfer geschlechtsspezifisch in den Versuch eingebracht wurden (siehe 2.4.3), erfolgte die Geschlechtsbestimmung anhand der Beborstung an Frons und Pronotum. Nach Schlyter und Cederholm (1981) ist bei männlichen

Käfern die Beborstung weniger dicht als bei Weibchen. Sie wird in der Arbeit von Schlyter und Cederholm (1981) mit durchschnittlich 301 Borsten/mm² für weibliche und 186 Borsten/mm² für männliche Käfer angegeben.



Abb. 6: Männliches Kopulationsorgan (Foto: Schachtler)

2.3 Sammelsysteme für flüchtige organische Verbindungen (VOCs)

Flüchtige organische Verbindungen (volatile organic compound(s)-VOCs) wurden im Rahmen dieser Arbeit an Adsorptionsröhrchen der Firma Sigma Aldrich (ORBO 402 TA, St. Louis, MO, USA) gebunden. Diese enthielten Tenax, ein Adsorbens für leicht flüchtige Substanzen. Für Freilandversuche wurden diese Adsorptionsröhrchen jedoch modifiziert, da hier auch 2-Methyl-3-buten-2-ol, eine hoch flüchtige organische Verbindung (VVOC) gesammelt werden sollte. Hierzu wurde den Röhrchen 100mg Carbotrap X 20/40 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) als zusätzliches Adsorbensbett hinzugefügt. Carbotrap X ist ein Adsorbens, welches in der Lage ist, VVOCs zurückzuhalten (Dettmer 2002).

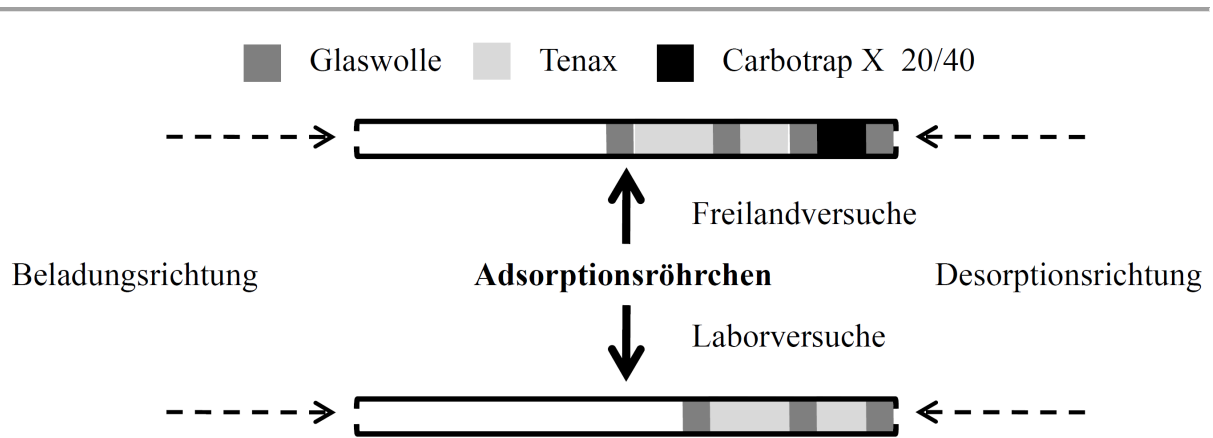


Abb. 7: Adsorptionsröhrchen ORBO 402 TA

2.3.1 Mobile VOC-Sammeleinheit

Für die Freilandforschung wurde im Rahmen der High Tech Offensive der Staatsregierung Bayern, im Forschungszentrum Karlsruhe GmbH am Institut für Meteorologie und Klimaforschung - Atmosphärische Umweltforschung (IMK-IFU) in Garmisch-Partenkirchen eine mobile VOC-Sammeleinheit entwickelt (Steinbrecher 2005), die im Durchfluss arbeitet. Im Wesentlichen bestand diese Sammeleinheit aus einer Membranpumpe (FM1101F, Fürgut, Tannheim, Deutschland), einem inerten PFA Schlauchsystem zur Aufnahme der Außenluft, dessen Gaseinlass mit einem Teleskopmast verbunden war (Abb. 9), vier Anschlussadapter für Adsorptionsröhrchen, Magnetventilen, einer Steuereinheit sowie einer Batterie zur Energieversorgung (Abb. 8). Weiterhin waren Sensoren zur Messung der Lufttemperatur, Luftfeuchte, Windgeschwindigkeit, Windrichtung und Globalstrahlung sowie ein GPS-Gerät installiert. Diese Sensoren fanden im Rahmen dieser Arbeit jedoch keine Verwendung. Zur Speicherung der Daten sowie zur Einstellung von Flüssen und Schaltung der Ventile war außerdem ein Computer integriert.

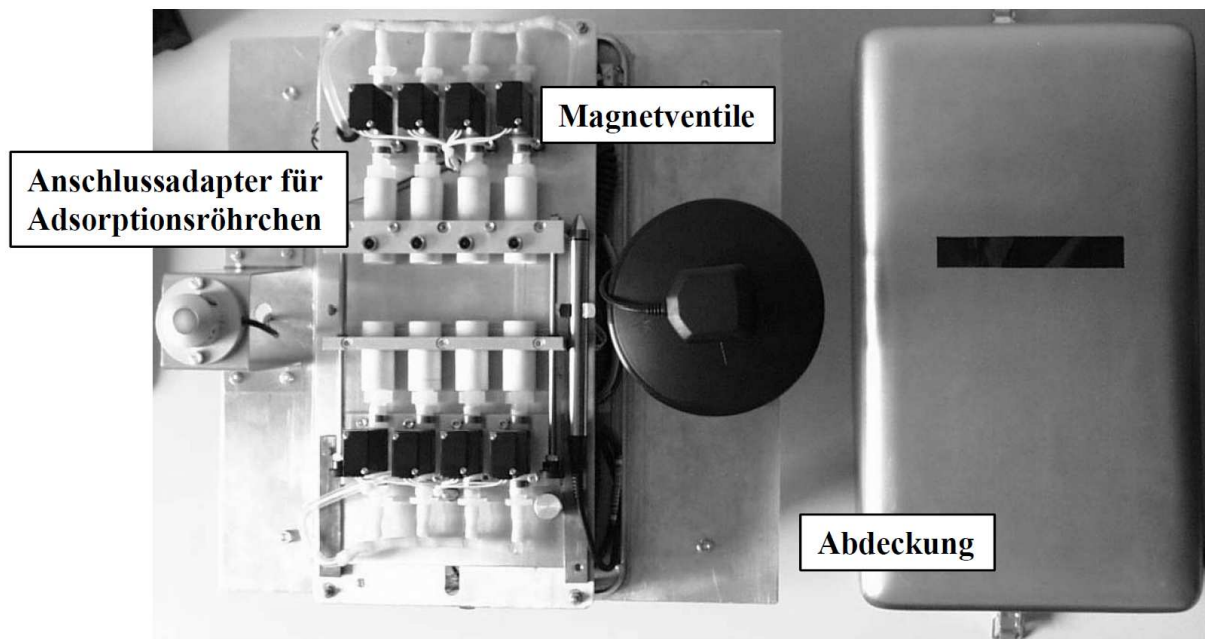


Abb. 8: Mobile VOC-Sammeleinheit (Foto: Steinbrecher)



Abb. 9: Teleskopmast zur punktgenauen Positionierung des Gaseinlasses der mobilen VOC-Sammeleinheit (Foto: Steinbrecher)

2.3.2 Mobiles Closed-Loop VOC-Sammelsystem

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die gezielte Beprobung von emittierten VOCs an Fichtenoberflächen im Freiland ein Closed-Loop System entwickelt (Abb. 10). Dieses bestand

Material und Methoden:

aus einer Membranpumpe (FM1101F, Fürgut. Tannheim, Deutschland), inerten PFA Schläuchen, einer Probenahmebox (22x34x12cm) und Verbindungsstücken für Adsorptionsröhrchen (Bohlender GmbH, Grünsfeld, Deutschland) (Abb. 11). Die Stromversorgung wurde durch Gel-Blei Akkus (NP7-12, Yuasa Battery, Inc., Laureldale, PA, USA) gewährleistet. Sowohl die Pumpe als auch der Akku waren in einer wasserdichten ehemaligen Waschpulverbox untergebracht (Abb. 12). Für zeitgleiche Untersuchungen wurde mit sechs derartigen Systemen gearbeitet.



Abb. 10: Mobiles Closed-Loop VOC-Sammelsystem



Abb. 11: Verbindungsstücke (Bohlender GmbH, Grünsfeld, Deutschland) zur Integration der Adsorptionsröhrchen

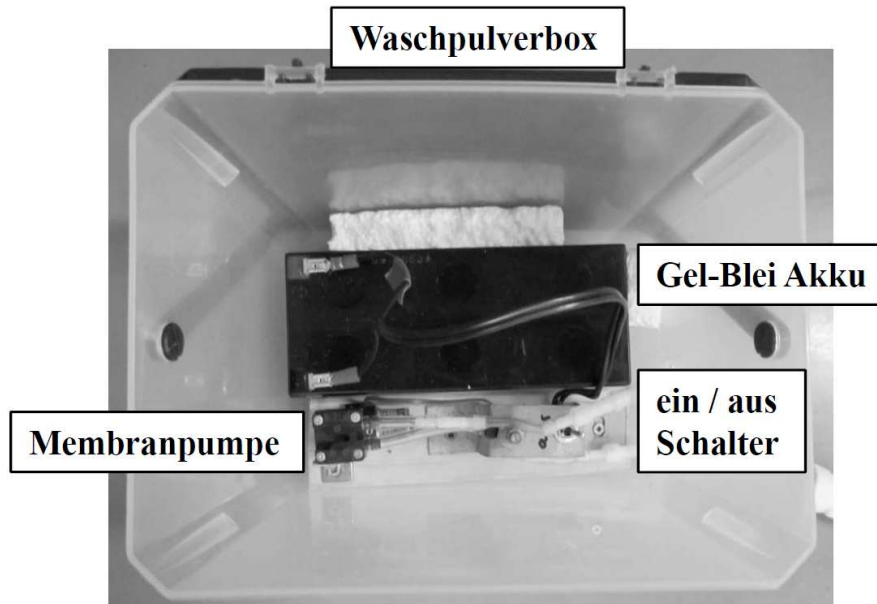


Abb. 12: Membranpumpen- und Akkueinheit (Foto: Ruber)

2.3.3 Labor Closed-Loop VOC-Sammelsystem

Für die Probenahme emittierter VOCs von Käfern in Laborversuchen wurden drei weitere Closed-Loop Systeme konstruiert. Diese bestanden aus einer Membranpumpe (NF 30 TTDC, KNF Neuberger GmbH, Freiburg, Deutschland), inerten PFA Schläuchen und Adaptern für den Anschluss der Adsorptionsröhrchen sowie einem Proberöhrchen für Testindividuen (Abb. 13). Die Stromversorgung wurde über ein Netzteil (Alcron, MW9112GS IC1200) gesteuert und über das Stromnetz gewährleistet.

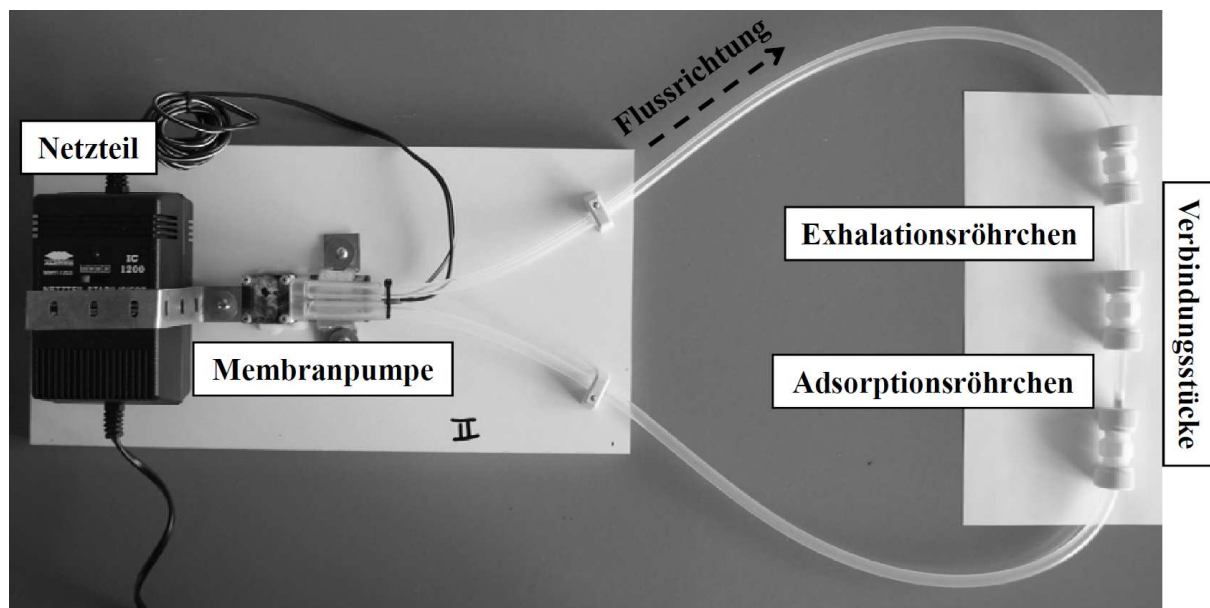


Abb. 13: Labor Closed-Loop VOC-Sammelsystem

2.4 VOC-Emission an befallenen Fichten

Während des zeitlichen Verlaufs eines Befalls von Fichten durch den Buchdrucker variiert die Emission von (-)- α -Pinen, cis-Verbenol und (-)-Verbenon. Verantwortlich für diese Variation sind Faktoren, die sich im zeitlichen Verlauf verändern, wie die Alterung der Brutbäume, die zeitliche Dynamik der Besiedlung durch verschiedene Besiedlungsphasen sowie der Entwicklungsfortschritt der Brut. Weitere emissionsbeeinflussende Faktoren können Tagesgang, Temperatur, Besiedlungsdichte und die vorhandenen Mengen an Vorstufen sein.

Zur Untersuchung der Effekte der genannten Faktoren auf die VOC-Emission wurden in der vorliegenden Arbeit drei Studien durchgeführt. Zwei Studien fanden im Freiland statt (siehe 2.4.1 und 2.4.2) und eine Studie im Labor (siehe 2.4.3). Letztere sollte Aufschluss über die Variabilität der VOC-Emission unter konstanteren Bedingungen als im Freiland bringen.

2.4.1 Zeitliche Variabilität der VOC-Emission im Tages- und Befallsverlauf

Die Datenaufnahme zu der ersten Studie fand im Zeitraum vom 14.07.2009 bis 10.09.2009 auf der Versuchsfläche Geißberg im Nationalpark Bayerischer Wald statt (Abb. 3). Neben dem Faktor der zeitlichen Veränderung der Brutsysteme und der Untersuchungsbäume, der im Folgenden als „Tage nach Befall“ bezeichnet wird, sollten in dieser Studie die emissionsbeeinflussenden Effekte von Tagesgang, Kambialtemperatur, Befallsdichte sowie mögliche Zusammenhänge zwischen cis-Verbenol-Emission und (-)-Verbenon-Emission untersucht werden. Diese wurden erwartet, da (-)-Verbenon ein Oxidationsprodukt von cis-Verbenol ist.

Hierzu wurden zu Versuchsbeginn sechs vom Buchdrucker unbefallene Bäume ausgewählt. Als Kriterium für Befallsfreiheit galten das Fehlen von Bohrmehlresten am Stamm, kein Nadelverlust und keine Verfärbung der Krone. Die ausgewählten Bäume wurden durch Mitarbeiter des Nationalparks gefällt. Da das Ziel dieser Studie die Untersuchung der Veränderlichkeit der VOC-Emission während eines gesamten Befallsverlaufs war, musste der Befallsbeginn zu einem definierten Zeitpunkt stattfinden. Hierzu wurde eine Besiedlung mit Hilfe von Pheromonködern (Pheroprax, BASF, Ludwigshafen am Rhein, Deutschland) initiiert. An jeden Versuchsbaum wurde ein Köder angebracht. Die Köder verblieben für eine Woche an den Bäumen und wurden nach erfolgreicher Besiedlung wieder entfernt. Eine erfolgreiche Besiedlung wurde durch Bohrmehlauswurf erkannt. Anschließend an die Besiedlung der Bäume wurden die emittierten Pheromone mit der mobilen VOC-Sammeleinheit (siehe 2.3.1, Durchfluss-System) im wöchentlichen Turnus aufgenommen.

Material und Methoden:

Vor jeder Probenahme wurde die VOC-Sammeleinheit mit frischen Adsorptionsröhrchen bestückt und eventuelle Verunreinigungen in dem Schlauchsystem der VOC-Sammeleinheit durch eine Spülung mit Umgebungsluft entfernt. Während der Spülphase von 1min Dauer wurde der Luftstrom an den Adsorptionsröhrchen vorbeigeführt. Zur Beprobung der Bäume wurde der Luftstrom durch die Adsorptionsröhrchen geleitet, wobei pro Baum immer nur ein Röhrchen befüllt wurde. Zum Sammeln der emittierten VOCs wurden mit dem Teleskopmast (Abb. 9) die gesamte Oberseite der Bäume in einem Abstand von ca. 1cm zur Rinde beprobt. Die Beprobung begann basal und endete apikal im Kronenbereich und hatte eine Dauer von 15min bei einem Fluss von 500ml/min. Nach der Sammelphase wurde das Probensammelsystem mit Umgebungsluft gespült. In dieser Zeit wurde die VOC-Sammeleinheit zu dem nächsten Versuchsbaum gebracht und die nächste Sammelphase gestartet. Da der Effekt des Tagesganges auf die VOC-Emission geprüft werden sollte, wurden die sechs Versuchsbaume pro Beprobung sowohl vormittags zwischen 10:00 - 12:00 Uhr als auch nachmittags zwischen 13:00 – 15:00 Uhr beprobt. Alle beladenen Adsorptionsröhrchen wurden mittels TD-GC-MS (siehe 2.7.1) analysiert. Mittels einer ebenfalls auf der Versuchsfläche Geißberg installierten meteorologischen Messstation der Bayerischen Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft wurde die Lufttemperatur während des gesamten Versuchszeitraumes aufgezeichnet und zur Berechnung der Kambialtemperatur verwendet. Hierzu diente die lineare Beziehung von Kambialtemperatur (KT) und Lufttemperatur (LT) ($KT=0,972*LT+0,409$), welche auf Luft- und Kambialtemperaturmessungen aus der folgenden Studie basierte (siehe Abb. 14 und 2.4.2). Zur Untersuchung des Effekts der Kambialtemperatur auf die VOC-Emission wurden die mittlere Kambialtemperatur zu den beiden Messzeiten (vormittags und nachmittags) verwendet.

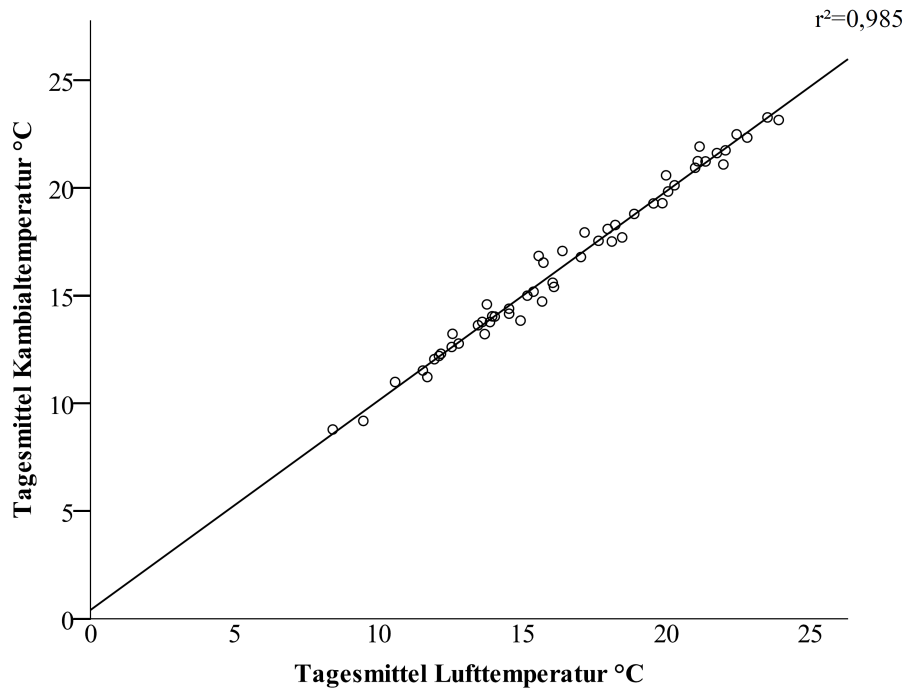


Abb. 14: Lineare Beziehung von Tagesmittel Lufttemperatur und Kambialtemperatur gemessen mit Thermloggern (iButton DS 1922L, Maxim Integrated Products, Inc., Sunnyvale, CA, USA) im Bast von acht liegenden Bäumen.

In diesem Versuch wurden neben den Effekten der genannten Faktoren auf die VOC-Emission auch die zu den Messtagen jeweilig vorherrschenden Entwicklungsstadien ermittelt. Dies erfolgte über die Berechnung der jeweils erreichten Gradtage (Summierung der mittleren Tageskambialtemperatur abzüglich des Entwicklungsnullpunktes von 8,3°C) und mit Hilfe der Angaben zur Dauer der temperaturabhängigen Entwicklung von *I. typographus* in Wermelinger (1998). Der fortschreitende Befall wurde per Bohrlochzählung aufgenommen. Auf der Oberseite der Versuchsbäume wurden in drei Regionen (an der Basis, mittig und im Kronenbereich) auf einer zufällig ausgewählten Fläche von je 100cm² Bohrlöcher zu jedem Messzeitpunkt gezählt.

2.4.2 Zeitliche Variabilität der VOC-Emission im Befallsverlauf in Abhängigkeit zur Besiedlungsdichte

Der zweite Versuch zur zeitlichen Variabilität der VOC-Emission wurde im Zeitraum vom 08.06.2010 bis 02.08.2010 ebenfalls auf der Versuchsfläche Geißberg im Nationalpark Bayerischer Wald durchgeführt (Abb. 3). Neben einer weiteren Aufnahme der zeitlichen Variabilität der Pheromonemission während eines kompletten Befallsverlaufs, dem emissionsbeeinflussenden Effekts der Kambialtemperatur sowie der Zusammenhänge der cis-Verbenol-Emission und der Emission von (-)-Verbenon, sollte hier speziell der Einfluss der Besiedlungsdichte und der Effekt von vorhandenem (-)- α -Pinen im Bast auf die VOC-

Material und Methoden:

Emission mitberücksichtigt werden. Hierzu wurden zu Beginn der Studie zehn unbesiedelte Fichten gefällt und auf einer Rindenfläche von jeweils 20x30cm gezielt mit Buchdruckern besiedelt. Die Besiedlung fand mit Hilfe von Einbohrhilfen statt. Diese bestanden aus je fünf PFA Schlauchabschnitten mit einem Durchmesser von 6mm und einer Länge von 4cm und waren quer (mit einem Zwischenabstand von ca. 5cm) auf einen Draht gesteckt. Die Einbohrhilfen wurden so um den Baum gelegt, dass eine Öffnung der Schlauchabschnitte plan auf der Rinde auflag (Abb. 15).



Abb. 15: Einbohrhilfen und Eppendorf Gefäße als Verschluss

Jeder Schlauchabschnitt der Einbohrhilfen wurde mit je vier Käfern bestückt und mit 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäßen verschlossen (Abb. 15). Die Käfer stammten aus einer lokalen pheromonbeköderten (Pheroprax, BASF, Ludwigshafen am Rhein, Deutschland) Schlitzfalle. Zur Untersuchung des Effekts der Besiedlungsdichte auf die VOC-Emission wurden zwei Besiedlungsdichten gewählt. Fünf der zehn betreffenden Bäume wurden mit je fünf Einbohrhilfen versehen und fünf Bäume mit nur je einer Einbohrhilfe. Die Einbohrhilfen verblieben drei Tage an den Bäumen und wurden nach erfolgreicher Besiedlung entfernt. Der Besiedlungserfolg wurde durch Bohrmehlauswurf in den Schlauchabschnitten festgestellt. Die besiedelten Flächen wurden anschließend wöchentlich mit dem mobilen Closed-Loop VOC-Sammelsystem (Abb. 10) beprobt. Zu Beginn jeder Probenahme wurden hierzu die Probenahmeboxen (Abb. 10) auf die befallene Flächen der Bäume gesetzt und mit einem Gurt befestigt, so dass die Ränder fest auf der Rindenoberfläche auflag. Mit PFA Schläuchen wurden die Probenahmeboxen mit den Pumpen der Closed-Loop-Systeme verbunden und

nach dem Einsetzen der Adsorptionsröhrchen eine 15 minütige Beprobung gestartet. Nach der Beprobung wurden die besiedelten Flächen mit Drahtgaze abgeschirmt. Dies hatte den Zweck die Anlage weiterer Brutsysteme durch angelockte Käfer aus der Umgebung zu unterbinden. Auch in diesem Versuch erfolgte die Analyse der beladenen Adsorptionsröhrchen per TD-GC-MS (siehe 2.7.1). Als Maß für den Vergleich des Effekts der Besiedlungsdichte auf die VOC-Emission, wurde das Verhältnis der emittierten Mengen pro Minute von (-)-Verbenon zu cis-Verbenol errechnet. Dies hatte den Hintergrund, dass bei dichter Besiedlung eine vermehrte Abgabe des repellent wirkenden (-)-Verbenons erwartet wurde. Somit sollte eine höhere Käferdichte zu einem größeren Wert des Verhältnisses führen und somit eine stärkere repellente Wirkung des befallenen Bereiches anzeigen. Da ebenfalls der Effekt des vorhandenen (-)- α -Pinen im Bast auf die VOC-Emission untersucht werden sollte, wurden an jedem Probenahmetag mit einem 10mm Stanzeisen Bastproben von jedem beprobten Baum genommen, um die jeweils aktuelle (-)- α -Pinenkonzentration feststellen zu können. Zur Analyse der Bastproben wurde im Labor von jeder Probe ein 2mm breiter Streifen mit einem Skalpell abgetrennt und anschließend in 200 μ l Hexan für 24h extrahiert. Die Quantifizierung der (-)- α -Pinenmenge pro Extrakt erfolgte per GC-MS (siehe 2.7.2). Anschließend wurde die so ermittelte Menge in Bezug zum Trockengewicht der extrahierten Bastprobenstreifen gesetzt. Am Ende dieser Studie wurden die besiedelten Rindenflächen mit einem Messer ausgeschnitten und anhand der entstandenen Rammelkammern die tatsächliche Besiedlungsdichte bestimmt. Wie bereits unter 2.4.1 beschrieben wurde die Lufttemperatur durch eine meteorologische Messstation der Bayerischen Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft aufgezeichnet. Kambialtemperaturen wurden in dieser Studie durch spezielle Thermologger (iButton DS 1922L, Maxim Integrated Products, Inc., Sunnyvale, CA, USA) gemessen, welche zu Versuchsbeginn in den Bast eingesetzt wurden. Sie zeichneten die Kambialtemperatur in einem stündlichen Intervall auf. Die entsprechenden Käferstadien während des Untersuchungszeitraumes wurden wie in 2.4.1 beschrieben mittels der Gradtage berechnet.

2.4.3 Zeitliche Variabilität der VOC-Emission im Befallsverlauf unter Laborbedingungen

Wie in den beiden zuvor beschriebenen Versuchen sollte in einem dritten Experiment ebenfalls die zeitliche Variabilität der VOC-Emission während eines Befallsverlaufs untersucht werden sowie ein möglicher Zusammenhang von der cis-Verbenol-Emission und der Emission von (-)-Verbenon. Diese Studie unterschied sich von den vorangegangenen

dadurch, dass sie im Labor durchgeführt wurde und somit weniger äußeren Einflüssen wie zum Beispiel schwankenden Temperaturen und Niederschlag unterlag. Die angewendete Sandwichmethode (Wermelinger und Seifert 1998; Kausrud *et al.* 2011) erlaubte zudem eine direkte visuelle Verfolgung des Befallsverlaufs auch auf der inneren Rindenseite (siehe Abb. 16).

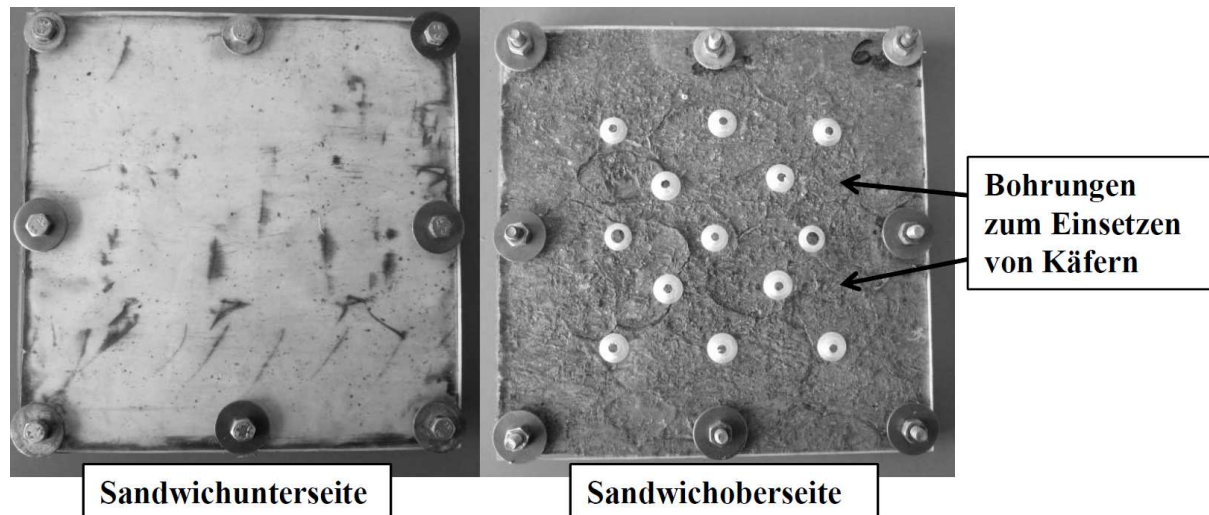


Abb. 16: Unter- und Oberseite eines Rindensandwiches mit einer Fläche von 20x20cm und 13 Bohrungen auf der Oberseite zum Einsetzen von Käfern (Foto: Ruber).

Zu Versuchsbeginn wurden insgesamt 25 Rindensandwiches vorbereitet. Hierzu wurden Rindenstücke mit einer Fläche von 20x20cm von Stammstücken einer unbefallenen Fichte abgeschält und zwischen zwei Plexiglasscheiben (Fläche 20x20cm) mit Schrauben fixiert (Abb. 16). Auf der Oberseite der Sandwiches befanden sich je 13 Bohrungen, welche zur Besiedlung dienten und wie in Abb. 16 dargestellt zueinander angeordnet waren. Beim Einsetzen der Rinde wurde die Borke stets in Richtung der Bohrungen ausgerichtet. Somit befand sich der Bast auf der Unterseite der Sandwiches und konnte durch die Plexiglasscheibe eingesehen werden. Die Sandwiches wurden in zwei Dichten besiedelt. Bei zehn Sandwiches wurden alle 13 Bohrungen mit je einem Männchen und zwei Tage später mit zwei Weibchen besetzt. Bei weiteren zehn Sandwiches wurden nur drei Bohrungen mit je einem Männchen und zwei Weibchen besetzt (Aufgrund reduzierter Einbohraktivität der Käfer in den Sandwiches konnte jedoch keine Besiedlung in zwei Dichten erreicht werden. Somit wurde die Besiedlungsdichte nicht berücksichtigt). Männliche und weibliche Käfer wurden anhand der Frons- und Pronotumbeborstung unterschieden (siehe 2.2.2). Die Seiten und die Bohrungen der Sandwiches wurden zur Fluchtvermeidung der Käfer mit Tesafilm abgeklebt, aber mit kleinen Luftlöchern versehen. Nach ca. einer Woche wurden die Tesafilmstreifen jedoch wieder entfernt, da eine Schimmelbildung durch zu hohe Luftfeuchtigkeit drohte.

Anschließend an die Besiedlung wurden die Sandwiches in einem wöchentlichen Turnus mit dem mobilen Closed-Loop VOC-Sammelsystem (Abb. 10) abgesaugt und flüchtige Verbindungen an Adsorptionsröhrchen gebunden. Anstelle der in der vorherig dargestellten Studie verwendeten Probenahmeboxen (Abb. 17) wurden in diesem Versuch gasdichte Kunststoffboxen verwendet, in die die Sandwiches hineingelegt werden konnten. Die Analyse der in dieser Studie mit VOCs beladenen Adsorptionsröhrchen fand per TD-GC-MS (2.7.1) statt.

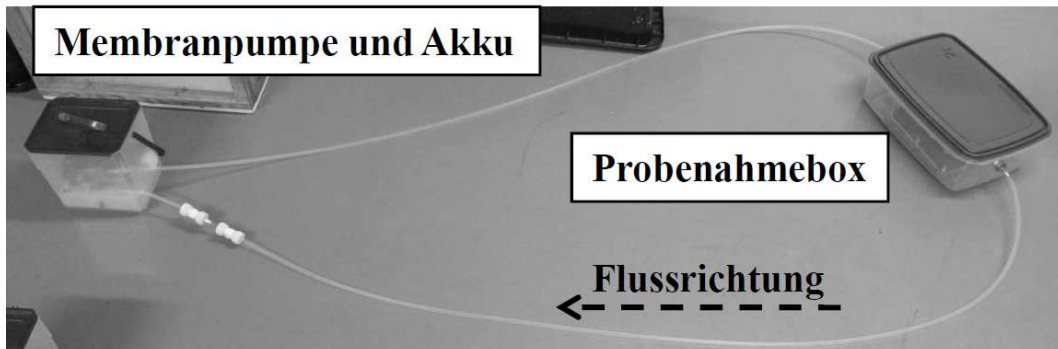


Abb. 17: Mobiles Closed-Loop VOC-Sammelsystem mit Probenahmebox zur Beprobung von Rindensandwiches (Foto: Ruber)

2.5 Tracheale VOC-Emission

I. typographus ist in der Lage die zur cis-Verbenol-Produktion notwendige Vorstufe (-)- α -Pinen über das Tracheensystem aufzunehmen und diese anschließend zu cis-Verbenol zu oxidieren (Klimetzek und Francke 1980; Reddemann 1993; Bohlander 1996). Bislang wird davon ausgegangen, dass die Freisetzung von cis-Verbenol über den Kot stattfindet (Vité und Francke 1976). In der vorliegenden Arbeit wurde eine tracheale Freisetzung des cis-Verbenols sowie dessen Oxidationsprodukt, dem auf Artgenossen repellent wirkenden (-)-Verbenon, nach trachealer Aufnahme von (-)- α -Pinen überprüft (siehe 2.5.1). Weiterhin interessierte, ob Käfer, welche zuvor (-)- α -Pinen tracheal aufgenommen haben, eine aggregierende Wirkung auf Artgenossen haben (siehe 2.5.3), sowie der Effekt von hohen Käferdichten auf die Emission von cis-Verbenol und (-)-Verbenon (siehe 2.5.4).

2.5.1 Tracheale Emission von cis-Verbenol und (-)-Verbenon

Zur trachealen Aufnahme von (-)- α -Pinen wurden die Käfer in einer künstlichen (-)- α -Pinen (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) Atmosphäre inkubiert. Hierzu wurden in dieser Untersuchung Käfer aus der oben beschriebenen Laborzucht (2.2.1) einzeln in 12ml gasdichte Inkubationsröhrchen überführt. Anschließend wurden mit einer 1 μ l Hamilton Spritze 0,48 μ l (-)- α -Pinen an den inneren Rand der Inkubationsröhrchen gespritzt und unmittelbar nach der

Material und Methoden:

Zugabe von (-)- α -Pinen die Röhrrchen verschlossen, um den Verlust von (-)- α -Pinen durch Verdampfung zu vermeiden. Die Käfer verblieben so 24h bei Raumtemperatur in den Inkubationsröhrrchen. Ein Drahtnetz, welches zuvor in die Inkubationsröhrrchen geschoben wurde, verhinderte einen physischen Kontakt der Käfer mit dem (-)- α -Pinen-Tropfen am Glasrand. Hiermit wurde eine orale (-)- α -Pinen-Aufnahme verhindert (Abb. 18).

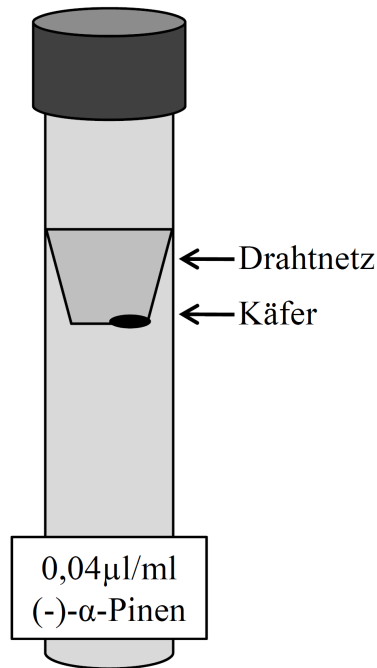


Abb. 18: Inkubationsröhrrchen mit einem Volumen von 12ml

Die in diesem Versuch verwendete Menge von 0,48 μ l (-)- α -Pinen basiert auf Untersuchungen von Bohlander (1996). Hier wurde die Mortalität von Käfern unter dem Einfluss von vier (-)- α -Pinenkonzentrationen (0,04 μ l/ml Gefäßvolumen, 0,08 μ l/ml, 0,12 μ l/ml und 0,4 μ l/ml) bestimmt. Da die Käfer bei der kleinsten Konzentration (0,04 μ l (-)- α -Pinen pro ml Gefäßvolumen) eine zu vernachlässigende Mortalität aufwiesen, wurde diese Konzentration zur Inkubation gewählt. Als Kontrollen dienten Käfer aus der Laborzucht, welche ebenfalls einzeln für 24h bei Raumtemperatur ohne (-)- α -Pinen in den Inkubationsröhrrchen verblieben. Zum Sammeln der Exhalationsprodukte wurden die Käfer nach der Inkubationszeit einzeln in die unter Abb. 13 dargestellten Exhalationsröhrrchen überführt. Die Enden der Röhrrchen wurden mit luftdurchlässigen Wattestopfen als Fluchtbarriere verschlossen. Anschließend wurden sowohl die Röhrrchen mit den Testindividuen als auch die Adsorptionsröhrrchen (Abb. 7) in Reihe in das Labor Closed-Loop VOC-Sammelsystem (Abb. 13) integriert. Bei einem Fluss von ca. 500ml/min, wurde jeder Käfer für 15min beprobt. Die Adsorptionsröhrrchen wurden nach der Beprobung mit 12ng internem Standard (Δ -2-Caren) in der unter Abb. 22 dargestellten Befüllungsanlage befüllt (2.7.1). Bis zur

gaschromatographischen Analyse lagerten die Adsorptionsröhrchen in gasdichten Gläschen in einem Kühlschrank bei 5°C.

Einer möglichen trachealen Emission von cis-Verbenol und (-)-Verbenon geht eine Produktion der beiden VOCs voraus. Die VOC-Produktion nach trachealer (-)- α -Pinenaufnahme sollte hier mittels Käferextraktanalyse überprüft werden. Hierzu wurden die Käfer zunächst in einem Gefrierschrank bei -20°C abgetötet. Zur Extraktion wurde jeder Käfer dekapitiert, in 1,5ml gasdichte Gläschen (Macherey-Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Deutschland) überführt und anschließend für 24h bei Raumtemperatur in 200 μ l Hexan (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) extrahiert. Als interner Standard diente Nonan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), welches in einer Konzentration von 0,1nmol/ μ l dem Hexan beigemischt war. Bis zur gaschromatografischen Analyse der Extrakte (siehe 2.7.2) lagerten diese in einem Gefrierschrank bei -20°C.

2.5.2 Pheromonproduktion toter Käfer

Es gibt Hinweise, dass (-)- α -Pinen mikrobiell transformiert (Bhattacharyya *et al.* 1960) oder durch Autoxidation zu trans-Verbenol, dem Isomer von cis-Verbenol, umgesetzt wird (Hunt *et al.* 1989). Aufgrund dieser Hinweise sollte in diesem Teil der Untersuchung geklärt werden, ob eine extrakorporale Transformation von (-)- α -Pinen zu cis-Verbenol auf der Oberfläche von *I. typographus* ohne physiologische Aktivität möglich ist. Hierzu wurden Käfer aus der Laborzucht im Gefrierschrank bei -20°C abgetötet. Im Anschluss wurden Käfer wie unter 2.5.1 beschrieben in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre für 24h bei Raumtemperatur inkubiert bzw. wie die entsprechenden Kontrollen behandelt. Eine anschließende Waschung in Hexan sollte Oxidationsprodukte von der Oberfläche der Käfer lösen. Hierzu wurde jeder Käfer in 200 μ l Hexan (mit 0,1nmol/ μ l Nonan als Standard) in 1,5ml gasdichten Glasgefäßen viermal geschwenkt und unmittelbar wieder aus der Waschlösung entfernt. Um eine cis-Verbenol-Produktion durch eventuell noch aktive käfereigene Enzyme zu untersuchen, wurden die bereits gewaschenen Käfer wie unter 2.5.1 beschrieben für 24h bei Raumtemperatur extrahiert. Waschlösungen und Extrakte wurden gaschromatographiert. Zusätzlich wurde eine Geschlechtsbestimmung der Testindividuen durch Sektion, wie unter 2.2.2. beschrieben, durchgeführt.

2.5.3 Attraktivität von Buchdruckern, die mit (-)- α -Pinen inkubiert wurden

Der Effekt von in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre inkubierten Buchdruckern auf Artgenossen wurde durch zwei Wahlexperimente getestet. In beiden Experimenten wurden

Käfern, welche frisch aus der Laborzucht entnommen wurden (Wahlkäfer), inkubierte Käfer und unbehandelte Käfer als Lockkäfer präsentiert.

In dem ersten Wahlexperiment diente ein Y-Rohr aus Glas als Versuchsarena. An allen drei Enden des Y-Rohres waren Plastikbehälter installiert. Am paarigen Ende des Y-Rohres befanden sich die inkubierten und unbehandelten Lockkäfer, die in Kollektivgrößen von einem, drei und fünf Individuen eingesetzt wurden. Den Lockkäfern war der Zugang zu dem Y-Rohr durch ein Drahtnetz versperrt. Am unpaaren Ende des Y-Rohres wurde jeweils ein Wahlkäfer eingesetzt, der sich für eines der Lockkäfer-Kollektive entscheiden sollte. Zur Erzeugung eines Luftstromes von ca. 850ml/min in Richtung der Wahlkäfer, wurde das unpaare Ende des Y-Rohres an eine Membranpumpe angeschlossen. Die eindringende Raumluft wurde durch vorgeschaltete Adsorptionsröhrchen gereinigt. Diese waren an den Plastikbehältern der inkubierten Käfer und Kontrollkäfer installiert (Abb. 19).

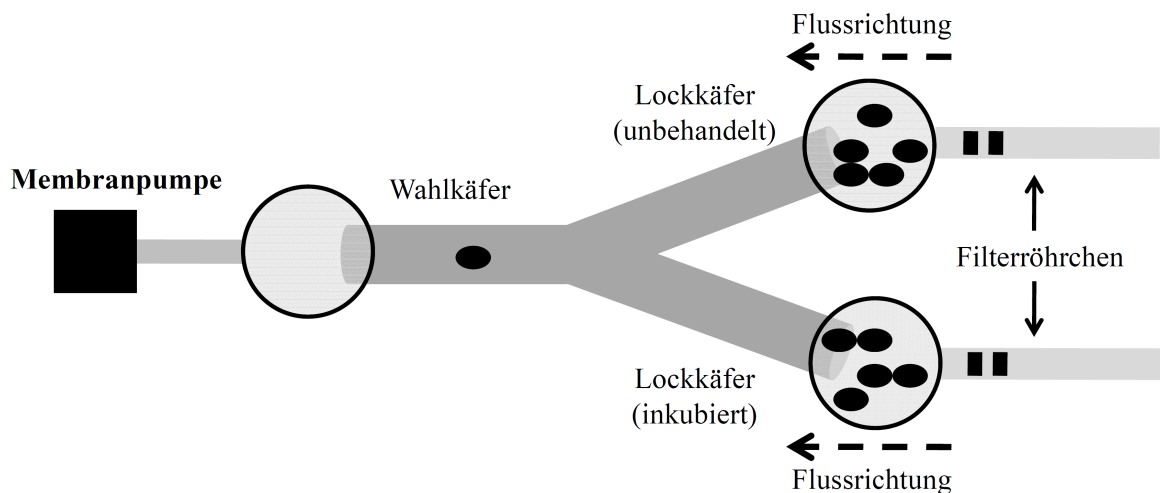


Abb. 19: Y-Rohr zur Untersuchung der Attraktivität von tracheal emittiertem cis-Verbenol

Jeweils nach dem Einsetzen der Wahlkäfer in das System wurde zunächst die Membranpumpe gestartet und die ganze Apparatur mit einem Karton abgedunkelt. Die Wahlkäfer konnten sich nun in Richtung der Lockkäfer bewegen. Durch Anheben des Kartons (alle 60s für ca. 2s), konnte die momentane Position der Wahlkäfer kontrolliert werden. Sobald sich die Wahlkäfer länger als 2min auf einer der beiden möglichen Seiten des Y-Rohrs aufgehalten hatten, wurden die Käfer als entschieden gewertet. Bei jedem Versuchsdurchgang wechselte die Position von inkubierten Käfern und Kontrollkäfern. Die Anzahl der durchgeführten Wiederholungen mit je einem inkubierten Käfer und Kontrollkäfer betrug 20 und bei den beiden anderen Lockkäferkollektiven je 30.

Material und Methoden:

Ein zweites Wahlexperiment wurde mit einem statischen Olfaktometer durchgeführt. Dieses bestand aus einer Platte aus Plexiglas, in die an den Eckpunkten eines gleichschenkligen Dreiecks drei PE-Behälter (30mm Durchmesser, 52mm Höhe; Semadeni, Ostermundigen, Schweiz) zur Positionierung von Lockkäfern versenkt waren. Die Behälter waren mit einem Deckel verschlossen, der eine Bohrung von 6mm enthielt und bündig mit der Oberfläche abschloss (Abb. 20).

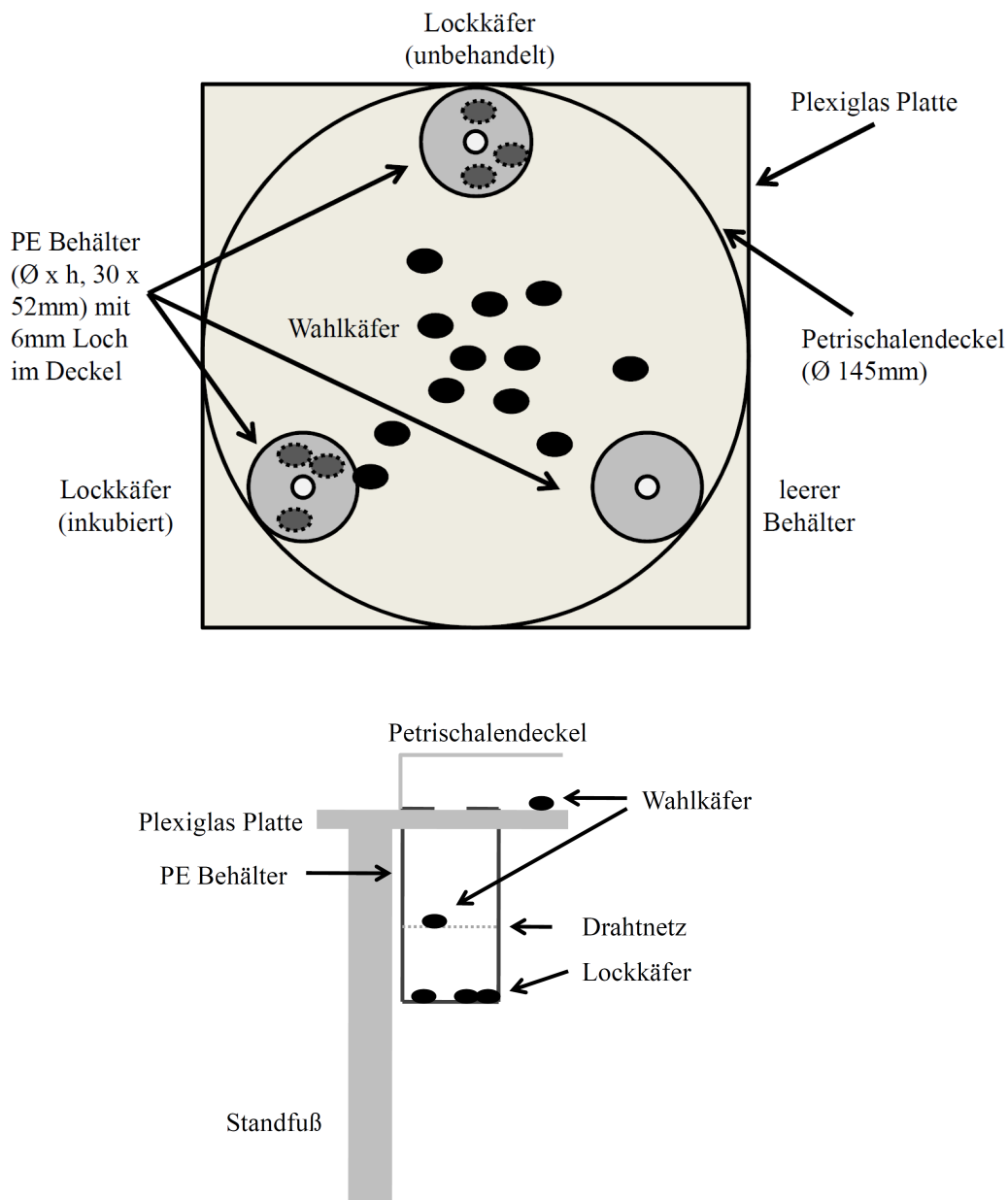


Abb. 20: Statisches Olfaktometer zur Untersuchung der Attraktivität von tracheal emittiertem cis-Verbenol (oben: Aufsicht; unten: Seitenansicht)

Jeder Versuchsdurchgang startete zunächst mit dem Einsetzen der inkubierten und unbehandelten Lockkäfer in die PE-Behälter. Ein PE-Behälter blieb bei jedem Durchgang als

Kontrolle leer. Nach dem Verschließen der PE-Behälter wurden 12 Wahlkäfer auf das Olfaktometer gesetzt und mit einem Petrischalendeckel abgedeckt. Das ganze System wurde schließlich mit einer lichtundurchlässigen Plastikbox abgedunkelt. Die Wahlkäfer konnten sich nun frei auf dem Olfaktometer bewegen. Im Falle einer attraktiven Wirkung der inkubierten Käfer, der Kontrollkäfer oder des leeren Behälters, konnten die Wahlkäfer durch die Öffnung im Deckel der PE-Behälter in das Innere gelangen. Ein Drahtnetz verhinderte hier die Durchmischung von Wahlkäfern mit den Käfern in den PE-Behältern. Nach zwei Stunden wurden die angelockten Wahlkäfer in den PE-Behältern gezählt. Für jeden Versuchsdurchgang wechselten die Positionen der Lockkäfer und des leeren Behälters. Beide Kollektivgrößen wurden je 30-mal getestet.

2.5.4 Einfluss der Käferdichte auf die tracheale Emission von VOCs

Diese Untersuchung sollte Aufschluss über den Einfluss unterschiedlicher Käferdichten auf die Produktion und tracheale Abgabe des attraktiv wirkenden Zielanalyten cis-Verbenol und dem repellent wirkenden (-)-Verbenon, sowie dem Verhältnis (-)-Verbenon zu cis-Verbenol unter Laborbedingungen mit der Möglichkeit der direkten Interaktion (olfaktorisch, taktil und visuell) geben. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die direkte Interaktion gelegt, da hiermit eine Situation simuliert werden sollte, wie sie bei einer Aggregation von Käfern nach einer tracheal eingeleiteten Aggregation eintreten könnte. Die Pheromonproduktion wurde hier, wie unter 2.5.1 beschrieben, mittels Inkubation in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre angeregt. Hierzu wurden Käferkollektive mit einer Größe von einem, drei und sechs Käfern ebenfalls in 12ml gasdichten Inkubationsröhrchen mit 0,48 μ l (-)- α -Pinen für 24h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubationsröhrchen hatten eine Höhe von 100mm und einen Innendurchmesser von ca. 12,5mm, so dass den Käfern am Boden der Gefäße eine Fläche von 122,72mm² zur Verfügung stand. Insgesamt wurden je zehn der Kollektive getestet. Anschließend an die Inkubation wurden die Exhalationsprodukte der Käferkollektive mittels der unter 2.3.3 dargestellten Closed-Loop-Systeme auf Adsorptionsröhrchen (Abb. 7) gesammelt. Die Analyse der Exhalationsprodukte erfolgte durch TD-GC-MS (siehe 2.7.1). Weiterhin wurden die Käfer nach Closed-Loop-Beprobung bei -20°C abgetötet und wie unter 2.5.1 beschrieben kollektivweise für 24h bei Raumtemperatur in 200 μ l Hexan (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) extrahiert. Die Extrakte wurden anschließend mittels GC-MS (siehe 2.7.2) analysiert.

2.6 Genetische Untersuchung zur Variabilität der Emission von cis-Verbenol und (-)-Verbenon

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte eine große Spreitung bei den durch den Buchdrucker emittierten Mengen an cis-Verbenol und (-)-Verbenon festgestellt werden. Ein großer Teil der Individuen produzierte/emittierte geringe Mengen an VOCs und ein kleiner Teil der Versuchstiere zeigte eine hohe Produktion/Emission von VOCs. Dieses Ergebnis und die Hinweise aus der Arbeit von Birgersson (1988), der das gleiche Produktionsmuster innerhalb der Versuchstiere beschrieb, führten zu der Hypothese, dass diese Individuen eine Rolle als Pionierkäfer bei der Aggregation zur Wirtsbesiedlung spielen. Mittels Isoenzymelektrophorese wurde in dieser Untersuchung nach einem erklärenden Muster für die beobachtete Spreitung, sowie nach einem Hinweis auf die Existenz von Pionierkäfern auf genetischer Ebene gesucht. Die untersuchten Enzymsysteme sind in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Untersuchte Enzymsysteme (Loci)

Abkürzung	Enzymsystem
AAT	Aspartat-Aminotransferase
EST	Esterase
FBP	Fructose-1,6-bisphosphatase
GPI	Glucose-6-Phosphat-Isomerase
HK	Hexokinase
IDH	Isocitrat Dehydrogenase
MDH	Malat-Dehydrogenase
PGM	Phosphoglucomutase

Zunächst wurden zur Produktion von cis-Verbenol und (-)-Verbenon Käfer aus der Laborzucht (siehe 2.2.1) wie unter 2.5.1 beschrieben in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre für 24h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend an die Inkubation wurden die Käfer in einem Gefrierschrank bei -20°C abgetötet und im gefrorenen Zustand in Mikrotiterplatten mit 50 μ l Tris-HCL Puffer (siehe 9.1.1) einzeln homogenisiert. Das Homogenat wurde mit 5mm x 3mm Filterpapierstreifen (Whatman, GE Healthcare, Chalfont St Giles, GB) aufgenommen. Die homogenisierten Käferkarkassen wurden in gasdichte 1,5ml Glasgefäße überführt und für 48h in 200 μ l Hexan (mit 0,1nmol/ μ l Nonan als interner Standard) bei Raumtemperatur extrahiert. Bis zur Quantifizierung der produzierten VOCs durch GC-MS (siehe 2.7.2) lagerten die Extrakte bei -20°C in einem Gefrierschrank. Für die Gelelektrophorese wurden je nach zu untersuchendem Enzymsystem verschiedene Trennsysteme, Gele und Trennbedingungen verwendet (siehe 9.1.2, 9.1.3 und 9.1.4). Für die

Material und Methoden:

Zubereitung der Gele wurden die entsprechenden Mengen der flüssigen und festen Komponenten in einer Unterdruckflasche mit einem Magnetrührer suspendiert und anschließend im Wasserbad für ca. 15min aufgeköcht. Mögliche Verklumpungen und Luftblasen wurden durch Schütteln bei angelegtem Vakuum entfernt. Im Anschluss wurde das noch flüssige Gel in Glasküvetten mit einem Maß von 12cm x 25cm x 0,5cm gegossen und nach Abkühlung bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert. Zu Beginn einer Gelelektrophorese wurden die Gele zur Aufnahme der mit Homogenat beladenen Filterpapierstreifen mit einem Abstand von 2cm zum Rand längs eingeschnitten. Pro Gel konnten 40 Filterpapierstreifen eingesetzt werden. Nach dem Einsetzen der Filterpapierstreifen wurden die Gele in den Glasküvetten in die Elektrophoresekammer (Omnilab-Krannich GmbH, Göttingen, Deutschland) zur Trennung der Isoenzyme überführt. Hier wurden die Gele mit Kühlplatten sowohl auf der Ober- als auch auf der Unterseite mit einer Umlaufkühlung auf 4°C temperiert. Anschließend wurden die zur Trennung der jeweiligen Isoenzyme benötigten Puffer in die Elektroden tanks eingefüllt und mit Schwammtüchern eine Elektrodenbrücke von den Puffern zu den Gelen hergestellt. Die Trennung erfolgte unter Gleichspannung. Die jeweiligen Puffer und Laufbedingungen der Gele sind im Anhang (siehe 9.1.2 und 9.1.3) dargestellt. Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Gele für Aktivitätsfärbung der getrennten Isozyme mit einem Gelschneider horizontal in 1,5mm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden nachfolgend in einer Glasschale mit der für die darzustellenden Isoenzyme entsprechenden Färbelösung (siehe 9.1.5 und 9.1.6) getränkt und in einem Brutschrank bei 40°C für 0,5-2h inkubiert. Sobald die Allelbanden sichtbar waren, wurde die Färbelösung entfernt, das Gel gewaschen und anschließend die Färbung mit Säure (15% Essigsäure, 7% Glycerin und 78% Wasser) fixiert. Für die Darstellung eines Zusammenhanges zwischen genetischem Muster und emittierter Menge an cis-Verbenol und (-)-Verbenon wurden die untersuchten Käfer klassifiziert. Die Individuen wurden nach den in den Extrakten gefundenen Mengen aufsteigend sortiert, zunächst in Quartile unterteilt, dann aber die beiden mittleren Quartile zu einer Klasse vereinigt so dass insgesamt 3 Klassen vorlagen: 0-25% (Klasse 1), 25-75% (Klasse 2) und >75% (Klasse 3). Lag ein Klassenübergang zwischen gleichen cis-Verbenolmengen, so wurden diese Individuen in der Klasse zugeordnet, in der die Anzahl gleicher Werte höher war. Befand sich der Übergang genau mittig zwischen gleichen Werten, so wurden alle Individuen mit dem gleichen Wert der kleineren Klasse zugeteilt. Mittels einer Präsenz-Absenz Analyse des geschlechtsspezifischen Locus HK/A, welcher nur bei männlichen Individuen festzustellen war, konnte eine Geschlechtsidentifizierung der

untersuchten Individuen durchgeführt werden. Zur Auswertung wurde nun die Allelverteilung der untersuchten Isoenzyme zwischen den Klassen und dem Geschlecht verglichen. Hierzu wurde das Programm Genepop 4.0 (Wood *et al.* 1966) verwendet.

2.7 Gaschromatographische Analysen

Die in dieser Arbeit gesammelten Proben emittierter VOCs von Käfern sowie Extrakte von Käfern wurden mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie analysiert. Aufgrund der unterschiedlichen Aggregatzustände der Proben mussten zwei verschiedene Verfahren zur Probenaufgabe auf die Trennsäulen der Gaschromatographen angewendet werden.

2.7.1 Thermodesorptions-Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Für gasförmig gesammelte und an Adsorptionsröhrchen gebundene Proben (emittierte VOCs) wurde ein EM 640 Thermodesorptions-Gaschromatographie-Massenspektrometrie (TD-GC-MS) System der Firma Bruker Daltonics (Billerica, MA, USA) verwendet. Die Thermodesorptionseinheit ermöglichte die in den Adsorptionsröhrchen gebundenen Substanzen auszuheizen und auf die Trennsäule des Gaschromatographen zu übertragen (Abb. 21). Ein externer Computer wurde zur Steuerung des Gaschromatographen und des Massenspektrometers sowie zur Darstellung, Sicherung und Auswertung der Daten verwendet.

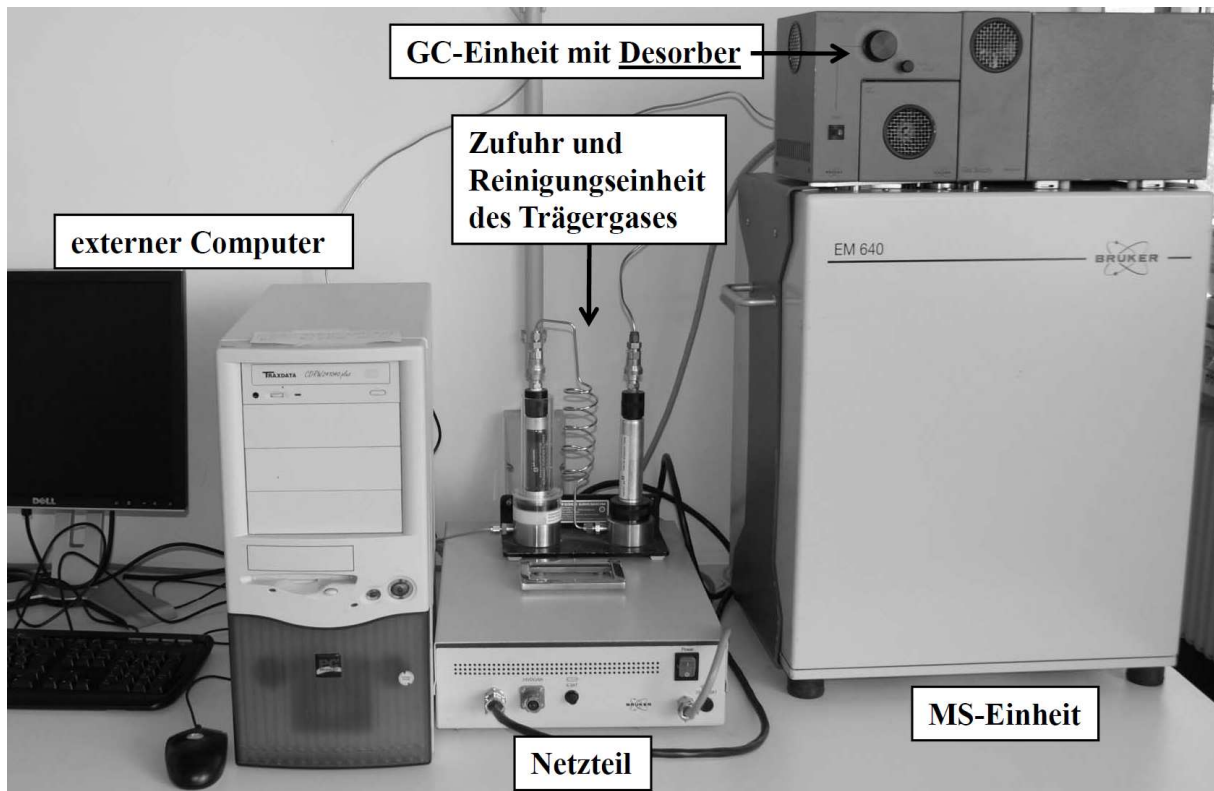


Abb. 21: Thermodesorptions-Gaschromatographie-Massenspektrometrie System EM 640 (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA)

Vor der gaschromatographischen Analyse wurde jedem Adsorptionsröhrchen noch ein interner Standard hinzugefügt. Dieser war zur Berechnung der Konzentrationen der einzelnen Analyten notwendig. Als interner Standard wurde Δ -2-Caren (SIAD Austria GmbH, St. Pantaleon, Österreich) gewählt, welches als Gasgemisch mit Stickstoff in einem Verhältnis von 100ppb vorlag. Der interne Standard wurde nach der Probenahme mit einem Beladungssystem (Abb. 22) auf die Adsorptionsröhrchen (Abb. 7) übertragen. Das Beladungssystem bestand aus einer Steckverbindung zum Anschluss der Adsorptionsröhrchen, einer Flowcontrollerbox zur Einstellung des Gasflusses, einem Flowcontroller, welcher den Gasfluss regelte, einer Stoppuhr, welche nach einer definierten Zeit ein Dreiwegeventil steuerte und einer Gasflasche mit dem internen Standardgasgemisch. Zur Herstellung eines konstanten Flusses musste das Beladungssystem vor jedem Beladungsvorgang für mindestens 15min gespült werden. Hierzu wurde die Gasflasche am Druckregler aufgedreht und der Druck auf 3bar justiert. Nach mindestens 15min und einem konstanten Fluss, dessen Stabilität an der gleichbleibenden Anzeige der Flowcontrollerbox kontrolliert wurde, wurden Adsorptionsröhrchen an das Beladungssystem (unter Beachtung der Beladungsrichtung Abb. 7) angeschlossen. Anschließend wurde die Stoppuhr ausgelöst und damit die Beladung gestartet. Jedes Adsorptionsröhrchen wurde mit einem Gasfluss von

10ml/min und einer Befüllzeit von 2min beladen, was einer Δ -2-Caren Menge von 12ng entsprach.

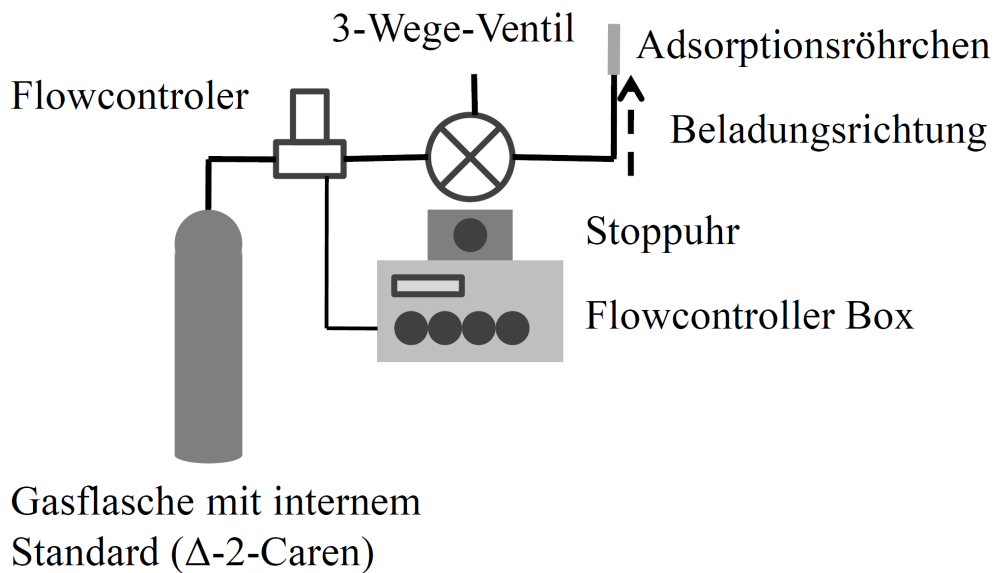


Abb. 22: Beladungssystem zur Beladung der Adsorptionsröhrchen mit internem Standard

Die mit internem Standard befüllten Adsorptionsröhrchen wurden in den Thermodesorber des GC-Systems eingeführt. Hier wurden die Röhrchen ausgeheizt und die gesammelten VOCs auf die Trennsäule, eine Quarzkapillarsäule HP-1ms (30m*0,25mm ID; Filmdicke 0,25 μ m) der Firma Varian (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) übertragen. Die Desorption war bei einer Temperatur von 260°C auf 60s festgelegt und erfolgte im splitless Modus. Als Trägergas wurde Helium mit einem Fluss von 4ml/min und einem Druck von 50hPA verwendet.

Tab. 2: Zielanalyten mit jeweiligen Leitmassen und Retentionszeiten

Zielanalyt	Leitmasse	Retentionszeit
2-Methyl-3-Buten-2-ol	71	6,18 min.
(-)- α -Pinen	93	13,43 min.
Δ -2-Caren	93	14,61 min.
cis-Verbenol	109	16,92 min.
(-)-Verbenon	107	17,90 min.

Zur Auftrennung der Gasproben in der Trennsäule startete das Temperaturprogramm bei 40°C und wurde für 4min konstant gehalten. Anschließend wurde die Temperatur mit 10°C/min auf 200°C und dann mit 20°C/min auf 260°C erhöht. Diese Endtemperatur wurde für 1min

beibehalten. Nach der Messung wurde das System bei einer Temperatur von 50°C und einem Fluss von 50ml/min gereinigt. Die Analyse der Proben wurde mittels zwei Untersuchungsmodi durchgeführt. In einem Hauptscan wurden die getrennten Substanzen mit einem Total-Ionen-Strom (Total Ion Current, TIC-Modus) erfasst. Hier wurden Massen zwischen 40 und 220 registriert. Die Zielanalyten wurden im sogenannten Single Ion Mode (SIM) analysiert. Hier wurden die Leitmassen-Fragmente der Zielanalyten detektiert (Tab. 2). Die Identifikation der Zielanalyten fand über den Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren von Referenzsubstanzen statt (Nachweisgrenze ca. 1ng). Zur Berechnung der einzelnen Konzentrationen wurde das Programm DataAnalysis 1.0 der Firma Bruker Daltonics (Billerica, MA, USA) verwendet.

2.7.2 Flüssiginjektions-Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Hexanextrakte der Käfer wurden mit einem Varian Saturn 2200 GC-MS System der Firma Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) analysiert. Dieses System war mit einer WCOT Quarzkapillarsäule CP-Cyclodextrin- β -2,3,6-M-19 (50m*0.25mm ID, Filmdicke 0.25 μ m, Agilent Technologies) ausgestattet. Es wurde 1 μ l je Probe mittels eines Injektors bei 200°C auf die Trennsäule gegeben. Als Trägergas wurde Helium mit einem konstanten Fluss von 1ml/min verwendet. Detektiert wurden Massen im Bereich zwischen 40 und 200. Mit folgendem Temperaturprogramm wurden die Proben getrennt: 40°C 5min isotherm, mit 5°C/min auf 80°C, 10min isotherm, mit 3°C/min auf 160°C, mit 20°C/min auf 220°C Endtemperatur. Alle Zielanalyten wurden über den Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren von Referenzsubstanzen identifiziert (Nachweisgrenze 0,001nmol/ μ l). Die Berechnung der Konzentrationen der einzelnen Substanzen fand mit dem Programm MS Workstation 6.0 der Firma Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) statt.

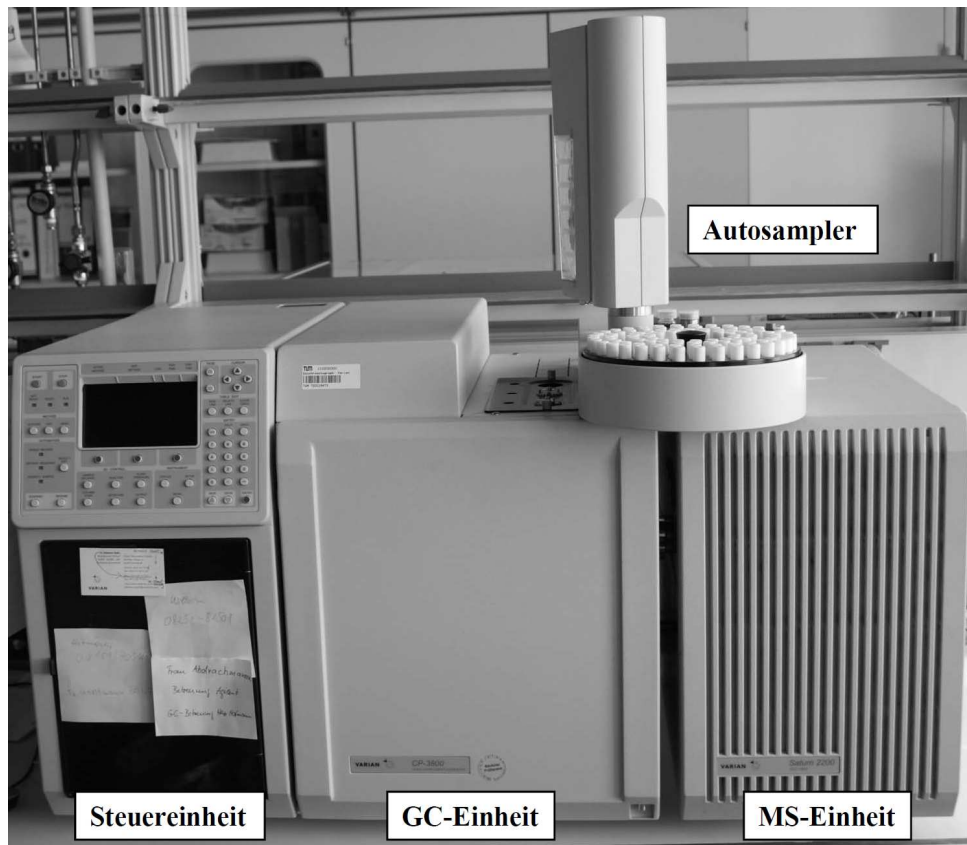


Abb. 23: Flüssiginjektions-Gaschromatographie-Massenspektrometrie System Varian Saturn 2200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

2.8 Statistik

Zur Datenaufbereitung wurde das Programm Excel (Office 2007; Microsoft, Redmond, WA, USA) verwendet. Alle statistischen Tests wurden mit SPSS statistics 19 (IBM, Armonk, NY, USA) sowie mit Genepop 4.0 (Wood *et al.* 1966) durchgeführt. Zur Überprüfung der Normalverteilung der Daten wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test verwendet. Die Varianzhomogenität wurde über den Levene-Test überprüft. Das Signifikanzniveau lag bei $\alpha \leq 0,05$.

2.8.1 Statistische Tests

VOC-Emission an befallenen Fichten:

Die Effekte der Faktoren „Tage nach Befall“, Kambialtemperatur, (-)- α -Pinenmenge pro mg Bast auf die Emission von (-)- α -Pinen, cis-Verbenol und (-)-Verbenon, sowie die Beeinflussung der (-)-Verbenon-Emission durch cis-Verbenol, wurde mittels linearer Regression bestimmt. Die gemessenen Werte der Variablen wurden hierzu durch Addition von 1 und Logarithmieren transformiert.

Die emittierten VOC-Mengen am Vormittag und Nachmittag sowie das Verhältnis von (-)-Verbenon zu cis-Verbenol bei starkem und schwachem Befall wurden mittels eines Wilcoxon-Test für Paardifferenzen auf Unterschiede geprüft.

Tracheale VOC-Emission:

Eine mögliche tracheale Exhalation von cis-Verbenol bzw. (-)-Verbenon und die Existenz der beiden Zielanalyten in Käferextrakten nach Inkubation in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre wurden mittels Vergleich der Häufigkeitsverteilungen von unbehandelten und inkubierten Käfern überprüft. Hierzu wurde ein Chi²-Homogenitätstest verwendet.

Der Effekt der Inkubation sowie der Effekt des Faktors Geschlecht auf die VOC-Mengen in den Exhalatproben wurde durch eine ANOVA bestimmt. Durch einen anschließenden LSD post hoc Test konnten die Exhalationseigenschaften zwischen den Gruppen (unbehandelt/Männchen, unbehandelt/Weibchen, inkubiert/Männchen und inkubiert/Weibchen) verglichen werden. Der Vergleich der VOC-Mengen in Käferextrakten wurde mit einem Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn-Bonferroni post hoc Test durchgeführt. Zur Analyse der Faktoreffekte auf die VOC-Mengen wurden nur Käfer einbezogen, bei denen eine VOC-Exhalation nachzuweisen war bzw. bei denen cis-Verbenol und (-)-Verbenon in den Extrakten gefunden wurde. Die gemessenen Werte wurden durch Logarithmieren transformiert.

Zur Überprüfung des Effekts von Käfern, welche zuvor (-)- α -Pinen tracheal aufgenommen hatten, auf Artgenossen im Y-Rohr, wurde die tatsächliche Häufigkeitsverteilung von angelockten und nicht angelockten Käfern mit einer erwarteten Verteilung (50% der Wahlkäferentscheidungen für inkubierte Käfer und 50% für unbehandelte Käfer) mit einem Chi²-Anpassungstest verglichen. Zur Überprüfung des Effekts von Lockkäfern auf Wahlkäfer in einem statischen Olfaktometer, wurde eine Friedman-ANOVA durchgeführt. Zur Ermittlung der jeweiligen Attraktivität der drei Wahlmöglichkeiten im statischen Olfaktometer (leerer Behälter, Behälter mit unbehandelten Käfern und Behälter mit inkubierten Käfern) wurde ein Dunn-Bonferroni post hoc Test angeschlossen.

Bei der Analyse des Einflusses von der Käferdichte auf die Exhalation und Produktion von cis-Verbenol und (-)-Verbenon, wurde das Verhältnis von emittiertem (-)-Verbenon zu

Material und Methoden:

cis-Verbenol sowie die cis-Verbenolmengen und (-)-Verbenonmengen nach Inkubation in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre bei drei Käferdichten (ein Käfer, drei Käfer und sechs Käfer pro Inkubationsröhrchen) mit einem Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Dunn-Bonferroni post hoc Test verglichen. Hierzu wurden die gemessenen Werte durch Addition von 1 und Logarithmieren transformiert.

Genetische Untersuchung zur Variabilität der Emission von cis-Verbenol und (-)-Verbenon

Zur Untersuchung, ob sich Buchdrucker, welche anhand emittierter Mengen an cis-Verbenol und (-)-Verbenon in drei Klassen eingeteilt werden konnten, auch anhand ihrer individuellen genotypischen Ausstattung unterscheiden lassen, wurden die Allelverteilungen über alle untersuchten Loci (Tab. 1) zwischen den drei Klassen und dem Geschlecht der Individuen mit einem exakten G-Test verglichen.

3 Ergebnisse:

3.1 VOC-Emission an befallenen Fichten

Die VOC-Emission wird während eines Brutzeitraumes durch Faktoren, die sich im zeitlichen Verlauf verändern, wie die Alterung der Brutbäume, verschiedene Besiedlungsphasen und durch den Entwicklungsfortschritt der Brut, sowie durch Kambialtemperatur, Besiedlungsdichte und die Existenz von Vorstufen beeinflusst. In diesem Versuch wurden in drei Experimenten die Effekte dieser Faktoren auf die Emission von (-)- α -Pinen, cis-Verbenol und (-)-Verbenon untersucht.

3.1.1 Zeitliche Variabilität der VOC-Emission im Tages- und Befallsverlauf

Auf der Versuchsfläche Geißberg wurde die zeitliche Variabilität der Emission von (-)- α -Pinen, cis-Verbenol und (-)-Verbenon an befallenen liegenden Fichten untersucht. Hierbei interessierte die zeitliche Emissionsvariabilität sowohl im Tages- als auch im Befallsverlauf, aber auch der Effekt der Kambialtemperatur auf die Emission der VOCs, der Effekt der sich im Befallsverlauf verändernden Befallsdichte auf die VOC-Emission und eine mögliche Korrelation zwischen cis-Verbenol-Emission und der Emission von (-)-Verbenon. Diese wurde aufgrund der Tatsache vermutet, dass (-)-Verbenon ein Oxidationsprodukt von cis-Verbenol ist. Zur Untersuchung der Effekte der oben genannten Faktoren auf die Emission der Zielanalyten wurden die sechs Versuchsbäume (siehe 2.4.1) in einem wöchentlichen Turnus vormittags (zwischen 10.00 und 12.00 Uhr) und nachmittags (zwischen 13.00 und 15.00 Uhr) mit der mobilen VOC-Sammeleinheit (Abb. 8) beprobt. Der Versuchszeitraum erstreckte sich vom 14.07.2009 bis 10.09.2009 und deckte damit den Zeitraum ab, in dem der Buchdrucker seine F2-Generation anlegt.

Zur Untersuchung des Tagesgangeffekts auf die VOC-Emission, wurden die Konzentrationen der VOCs der Vormittagsmessungen mit denen am Nachmittag verglichen. Hierbei stellte sich trotz der geringen Lufttemperaturunterschiede zwischen den beiden Messzeitpunkten (siehe Tab. 3) heraus, dass die Emission von cis-Verbenol vormittags höher war als nachmittags (Wilcoxon Test: $Z=274$, $p=0,043$, $n=42$). Die Vormittags- und Nachmittagsemissionen von (-)- α -Pinen und (-)-Verbenon unterschieden sich nicht (Wilcoxon Test: (-)- α -Pinen: $Z=501$, $p=0,536$, $n=42$; (-)-Verbenon: $Z=272$, $p=0,153$, $n=42$). Somit wurde eine zeitliche Variabilität der Emission im Tagesgang nur bei cis-Verbenol festgestellt (Abb. 24).

Ergebnisse:

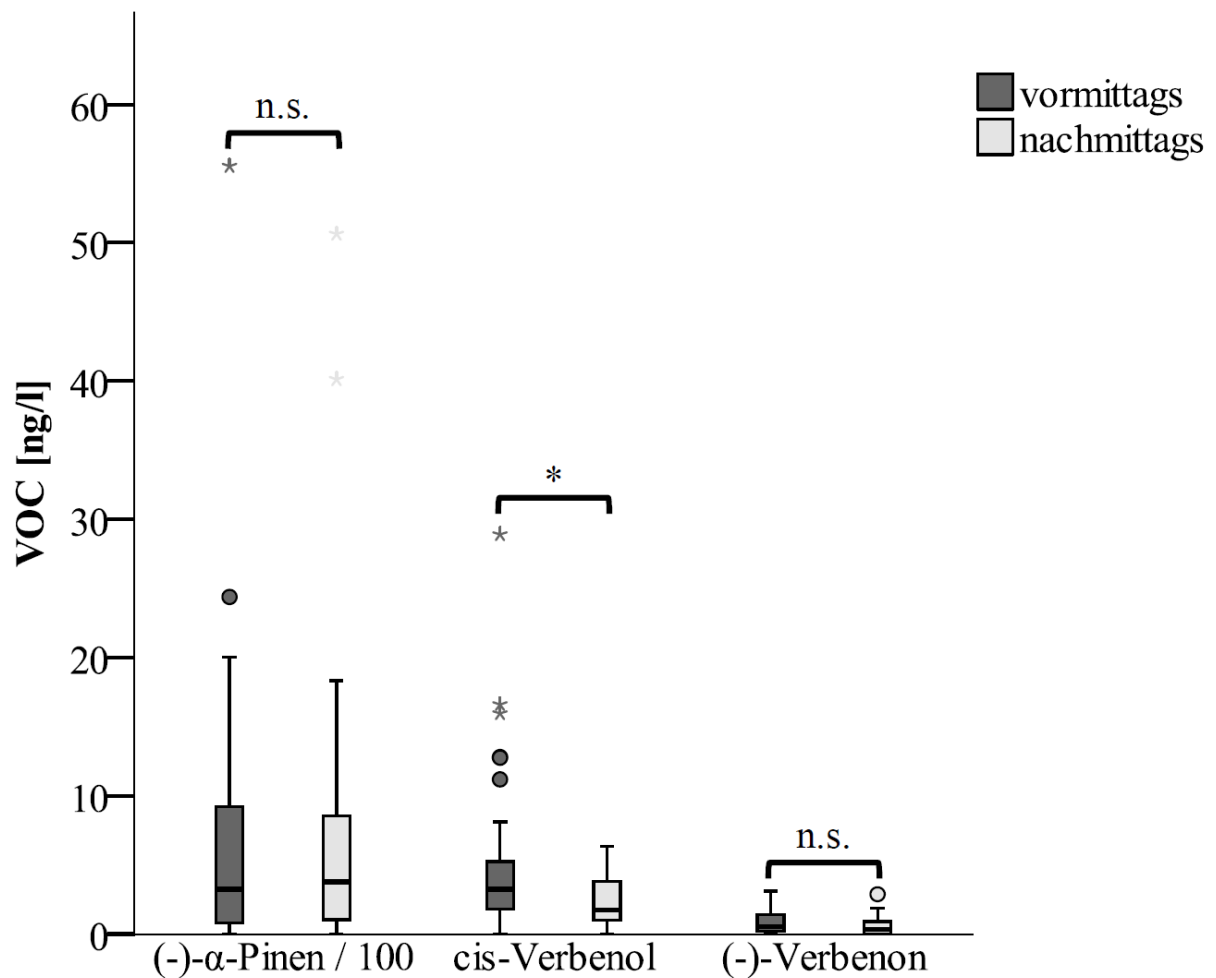


Abb. 24: Emittierte VOCs (in ng/l) im Vergleich der Messung am Vormittag (10:00-12:00 Uhr) und Nachmittag (13:00-15:00 Uhr). Dargestellt sind Median, obere und untere Quartile, Spannweite und Ausreißer. Die Klammern verbinden verglichene Datenpaare (Wilcoxon Test, n=42) (n.s.=nicht signifikant;* p<0,05).

Tab. 3: Mittlere Lufttemperaturen zu den VOC-Emissionsmessungen am Vormittag (10:00-12:00Uhr) und Nachmittag (13:00-15:00Uhr)

Datum	mittlere Lufttemperatur (10:00-12:00Uhr)	mittlere Lufttemperatur (13:00-15:00Uhr)
14.07.2009	25,30	25,80
23.07.2009	31,15	31,85
30.07.2009	23,00	22,30
06.08.2009	22,80	23,35
13.08.2009	17,05	17,30
20.08.2009	28,30	28,55
27.08.2009	23,90	23,90

Ergebnisse:

Die Aufzeichnung der Emissionen von (-)- α -Pinen, cis-Verbenol und (-)-Verbenon während des gesamten Befallsverlaufs ergab für jeden der drei Analyten ein spezifisches zeitliches Muster. Zunächst konnte festgestellt werden, dass (-)- α -Pinen zu jedem Messzeitpunkt im Vergleich zu cis-Verbenol und (-)-Verbenon mit den größten Mengen emittiert wurde. Die Werte der (-)- α -Pinen-Emission hatten vormittags eine Spannweite von 25-5554ng/l und nachmittags von 9-5063ng/l. Zum Ende der Datenaufnahme wurde ein Einbruch der (-)- α -Pinen-Emission festgestellt (Abb. 25 und Abb. 26). Die cis-Verbenol-Emission war zu Beginn des Befallsverlaufs am höchsten und nahm bis zum Abschluss der Studie ab (Abb. 25 und Abb. 26). Vormittags hatten die Werte eine Spannweite von Werten unterhalb der Nachweisgrenze bis 29ng/l und bei den Messungen am Nachmittag bis 6ng/l. Auffällig war hier eine erhöhte Emission zur Vormittagsmessung am 27.08.2009. Die Brut unter der Rinde befand sich zu diesem Zeitpunkt bereits im Käferstadium (Abb. 25). Bei der cis-Verbenol-Emission am Nachmittag konnte eine erhöhte Emission am 13.08.2009 festgestellt werden. Hier befand sich die Brut im Übergang zwischen dem Larven- und Puppenstadium (Abb. 26). Im Vergleich zu (-)- α -Pinen und cis-Verbenol war die (-)-Verbenon-Emission während des gesamten Untersuchungszeitraumes am geringsten (Abb. 25 und Abb. 26). (-)-Verbenon wies vormittags und nachmittags eine Emissionsspannweite von Werten unterhalb der Nachweisgrenze bis 3ng/l auf.

In den beiden folgenden Abbildungen sind zusätzlich zu dem Verlauf der VOC-Emission für die jeweiligen Messtage die mittleren Luft- und Kambialtemperaturen (jeweils gemittelt aus den Werten der Vormittags- bzw. Nachmittagsmessung), sowie die ermittelten Gradtage und die daraus abgeleiteten Entwicklungsstadien der Brut unter der Rinde dargestellt (siehe Abb. 25 und Abb. 26).

Ergebnisse:

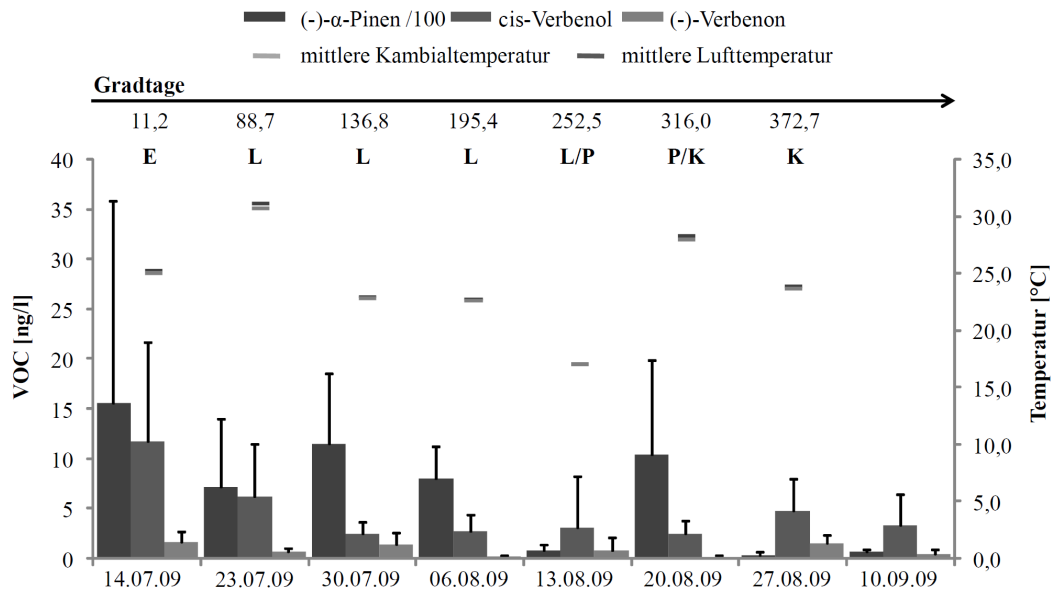


Abb. 25: Zeitlicher Verlauf emittierter VOCs (in ng/l) aus liegenden durch den Buchdrucker befallenen Fichten (n=6). Die senkrechten Linien über den Säulen markieren die Standardabweichung. Mittlere Luft- und Kambialtemperaturen an den jeweiligen Probenahmetagen zur Messzeit am Vormittag (10:00-12.00 Uhr) sind durch kurze Striche über den Säulen dargestellt. Der horizontale Pfeil symbolisiert die Temperatursumme und die genannten Zahlen markieren die zu den Messzeitpunkten jeweils erreichten Gradtage. Die daraus abgeleiteten Entwicklungsstadien der Brut unter der Rinde sind unterhalb der Gradtage dargestellt (E = Ei, L = Larve, P = Puppe, K = Käfer).

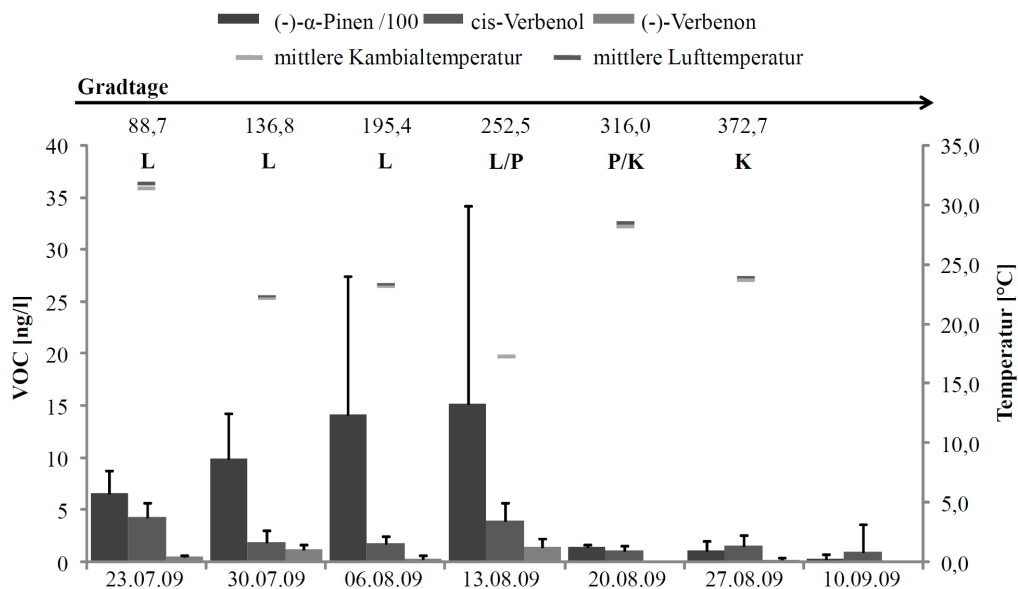


Abb. 26: Zeitlicher Verlauf emittierter VOCs (in ng/l) aus liegenden durch den Buchdrucker befallenen Fichten (n=6). Die senkrechten Linien über den Säulen markieren die Standardabweichung. Mittlere Luft- und Kambialtemperaturen an den jeweiligen Probenahmetagen zur Messzeit am Nachmittag (13:00-15.00 Uhr) sind durch kurze Striche über den Säulen dargestellt. Der horizontale Pfeil symbolisiert die Temperatursumme und die genannten Zahlen markieren die zu den Messzeitpunkten jeweils erreichten Gradtage. Die daraus abgeleiteten Entwicklungsstadien der Brut unter der Rinde sind unterhalb der Gradtage dargestellt (E = Ei, L = Larve, P = Puppe, K = Käfer).

Ergebnisse:

Weiterhin wurde der Einfluss der sich im zeitlichen Verlauf verändernden Befallsdichte auf die VOC-Emission und damit der Attraktivität der Untersuchungsbäume untersucht. Hintergrund hierfür war die Annahme, dass bei steigender Befallsdichte die Emission des auf Artgenossen repellent wirkenden (-)-Verbenon ansteigt und somit die Attraktivität der Untersuchungsbäume abnimmt. Als Repellentsmaß wurde das Verhältnis von emittiertem (-)-Verbenon zu cis-Verbenol eingeführt, welches bei zunehmender Befallsdichte ansteigen sollte. Das Verhältnis der beiden Analyten im zeitlichen Verlauf ist in Abb. 27 dargestellt. Der Verlauf der Befallsdichte ist in Abb. 28 abgebildet. Diese wurde durch Bohrlochzählungen auf der Oberfläche der Untersuchungsbäume an den jeweiligen Messtagen auf drei zufällig ausgewählten Flächen mit einer Größe von 100cm² aufgenommen. Beim Vergleich des Befalls zwischen den Messtagen, konnte ein leichter aber nicht signifikant messbarer Anstieg beobachtet werden (Friedman ANOVA: $\chi^2=8,52$, $p=0,289$, $n=6$). Ein Anstieg der (-)-Verbenon-Emission zeichnete sich nicht ab (siehe Tab. 4). Die in Abb. 27 dargestellten Anstiege des Repellentsmaßes am 30.07.2009 ist maßgebend durch die cis-Verbenol-Emission beeinflusst.

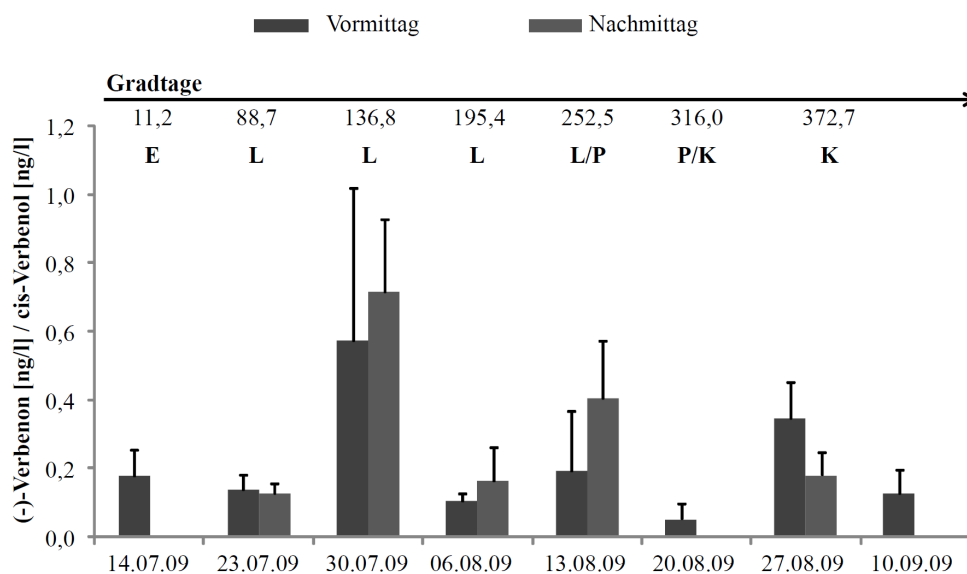


Abb. 27: Zeitlicher Verlauf des Verhältnisses von emittiertem (-)-Verbenon / cis-Verbenol (beide in ng/l) am Vormittag und Nachmittag. Der horizontale Pfeil symbolisiert die Temperatursumme. Die genannten Zahlen markieren die zu den Messzeitpunkten jeweils erreichten Gradtage. Unterhalb der Gradtage sind die zu den Messzeitpunkten erreichten Entwicklungsstadien der Brut unter der Rinde dargestellt (E = Ei, L = Larve, P = Puppe, K = Käfer).

Ergebnisse:

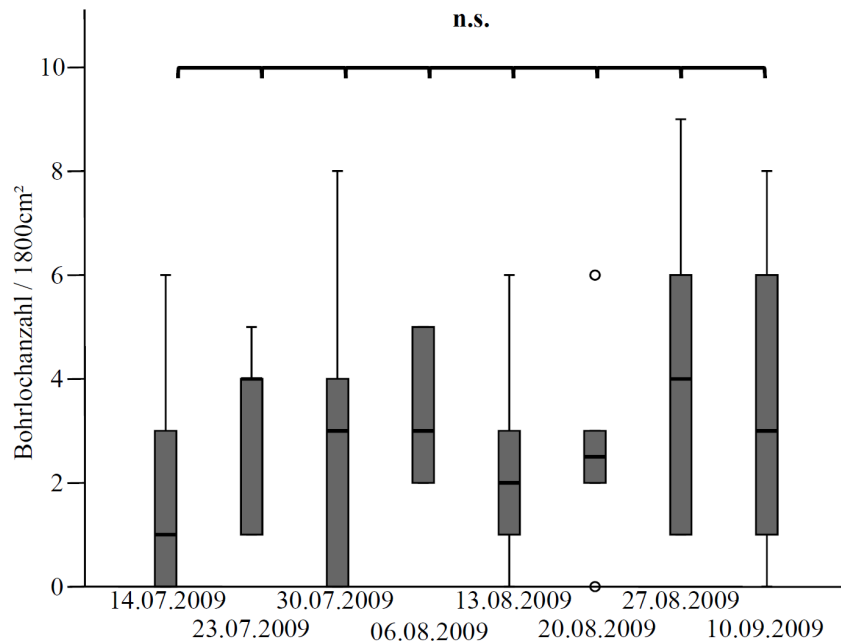


Abb. 28: Bohrlochanzahl aller sechs Versuchsbäume je Probenahmetag (n=6). Je Versuchsbäum und Probenahmetag wurden an der Basis, in der Mitte und im Kronenbereich Bohrlöcher auf einer Fläche von 100cm² auf der Oberseite gezählt. Dargestellt sind Median, obere und untere Quartile, Spannweite und Ausreißer. Die Klammern verbinden verglichene Datenpaare (Friedman ANOVA) (n.s.=nicht signifikant).

Die in dieser Studie untersuchte Variabilität der Emission von (-)- α -Pinen, cis-Verbenol und (-)-Verbenon wurde maßgeblich von dem Faktor „Tage nach Befall“ beeinflusst. Je mehr Zeit zwischen Befall- und Messzeitpunkt lag, desto weniger VOCs wurden emittiert (siehe Abb. 29 und Abb. 30). Die Kambialtemperatur konnte nur teilweise als beeinflussender Faktor festgestellt werden. Mit ansteigender Kambialtemperatur erhöhte sich in den signifikanten Fällen die Emission (Tab. 4).

Ergebnisse:

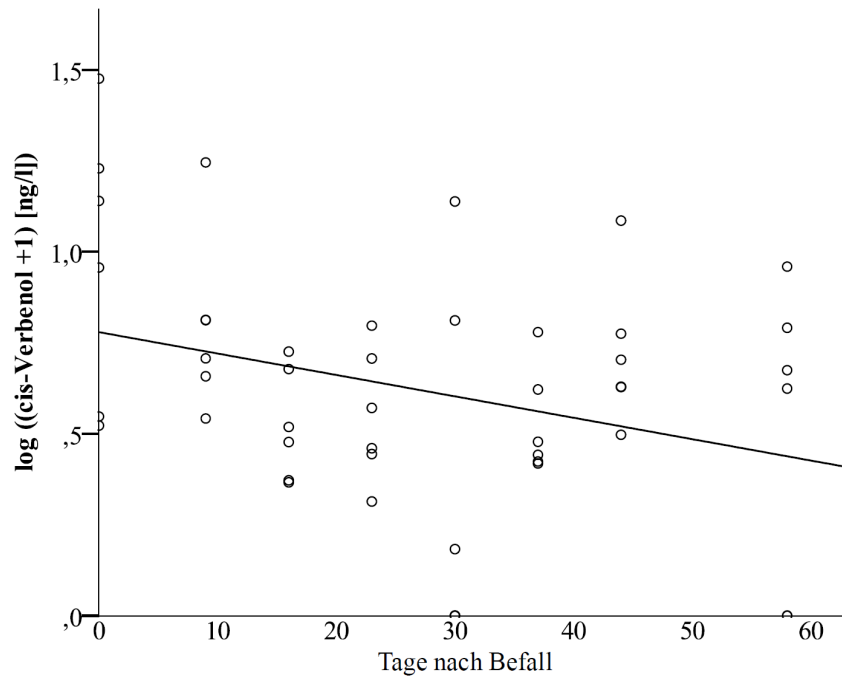


Abb. 29: Lineare Regression von „Tage nach Befall“ und emittiertem cis-Verbenol (in ng/l +1 durch log transformiert) zum Messzeitpunkt am Vormittag zwischen 10:00 und 12:00 Uhr ($r^2= 0,1$, $p=0,029$).

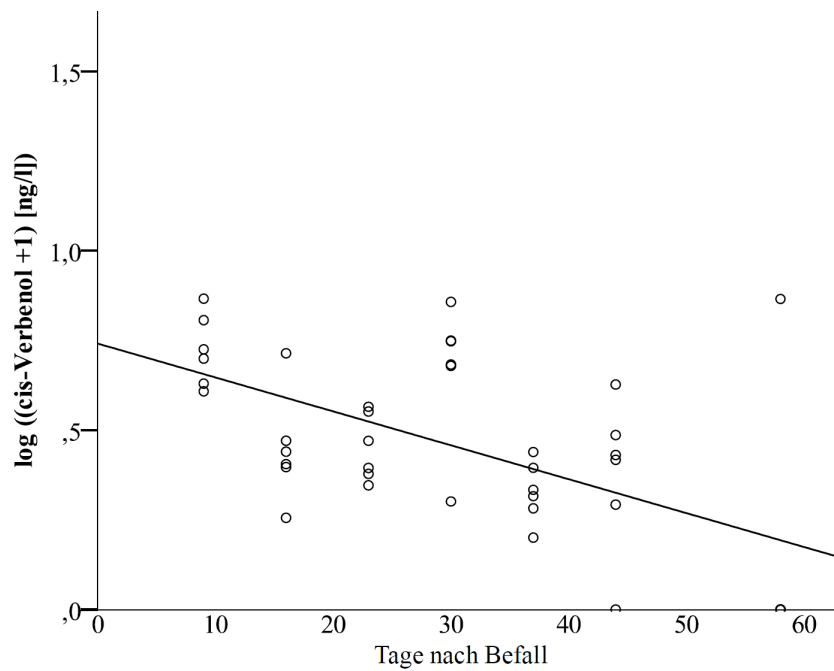


Abb. 30: Lineare Regression von „Tage nach Befall“ und emittiertem cis-Verbenol (in ng/l +1 durch log transformiert) zum Messzeitpunkt am Nachmittag zwischen 13.00 und 15:00 Uhr ($r^2= 0,34$, $p<0,001$).

Ergebnisse:

Tab. 4: Übersicht der Regressionsanalyse bezüglich des Effekts der Faktoren „Tage nach Befall“ und „Kambialtemperatur“ auf die Emission von (-)- α -Pinen, cis-Verbenol und (-)-Verbenon jeweils zu den Messzeitpunkten am Vormittag zwischen 10:00-12:00 Uhr und Nachmittags zwischen 13:00-15:00 Uhr.

Messzeitpunkt	Faktor	Variable	r ²	p	Steigung der Regressionsgeraden
Vormittags	Tage nach Befall	(-)- α -Pinen	0,35	<0,001	negativ
Vormittags	Tage nach Befall	cis-Verbenol	0,10	0,029	negativ
Vormittags	Tage nach Befall	(-)-Verbenon	0,07	0,065	negativ
Vormittags	Kambialtemperatur	(-)- α -Pinen	0,12	0,025	positiv
Vormittags	Kambialtemperatur	cis-Verbenol	0,12	0,023	positiv
Vormittags	Kambialtemperatur	(-)-Verbenon	0,00	0,867	
Nachmittags	Tage nach Befall	(-)- α -Pinen	0,52	<0,001	negativ
Nachmittags	Tage nach Befall	cis-Verbenol	0,34	<0,001	negativ
Nachmittags	Tage nach Befall	(-)-Verbenon	0,30	<0,001	negativ
Nachmittags	Kambialtemperatur	(-)- α -Pinen	0,05	0,187	
Nachmittags	Kambialtemperatur	cis-Verbenol	0,00	0,970	
Nachmittags	Kambialtemperatur	(-)-Verbenon	0,30	0,001	negativ

Da (-)-Verbenon ein Oxidationsprodukt von cis-Verbenol ist, wurde eine Korrelation zwischen emittierten cis-Verbenolmengen und (-)-Verbenonmengen erwartet. Bis auf den 30.07.2009 konnte bei den Messungen am Vormittag an allen Messtagen eine Korrelation gefunden werden. Eine Erhöhung der cis-Verbenol-Emission führte auch zu einer gesteigerten Emission von (-)-Verbenon. Dieser Effekt ließ sich auch bei der Überprüfung der Emissionsbeziehung der beiden Analyten zeigen, bei der nicht an einzelnen Messtagen, sondern über den gesamten Versuchszeitraum hinweg geprüft wurde.

Nachmittags hingegen konnte eine signifikante Beziehung zwischen der cis-Verbenol-Emission und der Emission von (-)-Verbenon nur im Vergleich über den gesamten Versuchszeitraum nachgewiesen werden. An den jeweiligen Messtagen selbst wurde keine signifikante Beziehung der Emission der beiden Analyten beobachtet (siehe Tab. 5).

Ergebnisse:

Tab. 5: Übersicht der Regressionsanalyse zwischen emittiertem cis-Verbenol und (-)-Verbenon pro Probenahmetag und während des gesamten Probezeitraums zu den Messzeitpunkten am Vormittag und Nachmittag.

Probenahmetag	Messzeitpunkt	Faktor	Variable	r²	p
14.07.2009	Vormittags	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,82	0,014
23.07.2009	Vormittags	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,91	0,003
30.07.2009	Vormittags	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,31	0,254
06.08.2009	Vormittags	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,96	0,001
13.08.2009	Vormittags	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,98	<0,001
20.08.2009	Vormittags	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,67	0,046
27.08.2009	Vormittags	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,81	0,015
10.09.2009	Vormittags	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,70	0,039
Probezeitraum gesamt	Vormittags	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,56	<0,001
23.07.2009	Nachmittags	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,42	0,167
30.07.2009	Nachmittags	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,49	0,124
06.08.2009	Nachmittags	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,54	0,095
13.08.2009	Nachmittags	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,53	0,099
20.08.2009	Nachmittags	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	-	-
27.08.2009	Nachmittags	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,57	0,083
10.09.2009	Nachmittags	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	-	-
Probezeitraum gesamt	Nachmittags	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,36	<0,001

3.1.2 Zeitliche Variabilität der VOC-Emission im Befallsverlauf in Abhängigkeit zur Besiedlungsdichte

Im Jahr 2010 wurde auf der Versuchsfläche Geißberg eine weitere Untersuchung zur Variabilität der VOC-Emission im Befallsverlauf durchgeführt. Zielanalyten waren in dieser Studie ebenfalls (-)- α -Pinen, cis-Verbenol und (-)-Verbenon. Neben der zeitlichen Variabilität, wurde hier der Einfluss von zwei Besiedlungsdichten untersucht. Die Untersuchung war geleitet von der Fragestellung, ob die repellent wirkende Pheromonkomponente (-)-Verbenon als Oxidationsprodukt von cis-Verbenol, welches während des Fraßes von Käfern und Larven als Entgiftungsprodukt von (-)- α -Pinen entsteht, bei hohen Käfer- und Larvendichten vermehrt emittiert wird. Weiterhin interessierte in diesem Versuch auch der Effekt der Kameraltemperatur auf die VOC-Emission, die Existenz einer möglichen Korrelation zwischen der Emission von cis-Verbenol und (-)-Verbenon, sowie der Effekt der vorhandenen Menge an (-)- α -Pinen im Bast auf die

Ergebnisse:

Emission der drei Zielanalyten. Zur Untersuchung wurden fünf liegende Bäume schwach und fünf liegende Bäume stark besiedelt und zum Zeitpunkt der Anlage der F1 Generation vom 11.06.2010 bis 02.08.2010 mit dem mobilen Closed-Loop VOC-Sammelsystem (Abb. 10) wöchentlich beprobt.

Aufgrund der Vermutung, dass das Verhältnis des emittierten (-)-Verbenon zu cis-Verbenol die Attraktivität eines Wirtes beeinflusst (je höher der Wert des Verhältnisses, umso höher die repellente Wirkung), wurde dieses Verhältnis bei schwachem und starkem Befall verglichen. Die Besiedlungskategorien stark und schwach wurden anhand der entstandenen Rammelkammern bestimmt. Bei starkem Befall wiesen die Rindenflächen eine durchschnittliche Anzahl an Rammelkammern von 16,4 auf. Auf 100cm² bezogen entspricht das einer Rammelkammerzahl von 2,73. Bei schwachem Befall waren es im Durchschnitt 6,2 (=1,03 Rammelkammern/100cm²). Das Verhältnis des emittierten (-)-Verbenon zu cis-Verbenol unterschied sich zwischen den beiden Befalldichten signifikant (Wilcoxon Test: $Z=267$, $p=0,013$, $n=43$). Entgegen der Erwartung konnte bei schwachem Befall ein größerer Wert als bei starkem Befall festgestellt werden (siehe Abb. 31).

Ergebnisse:

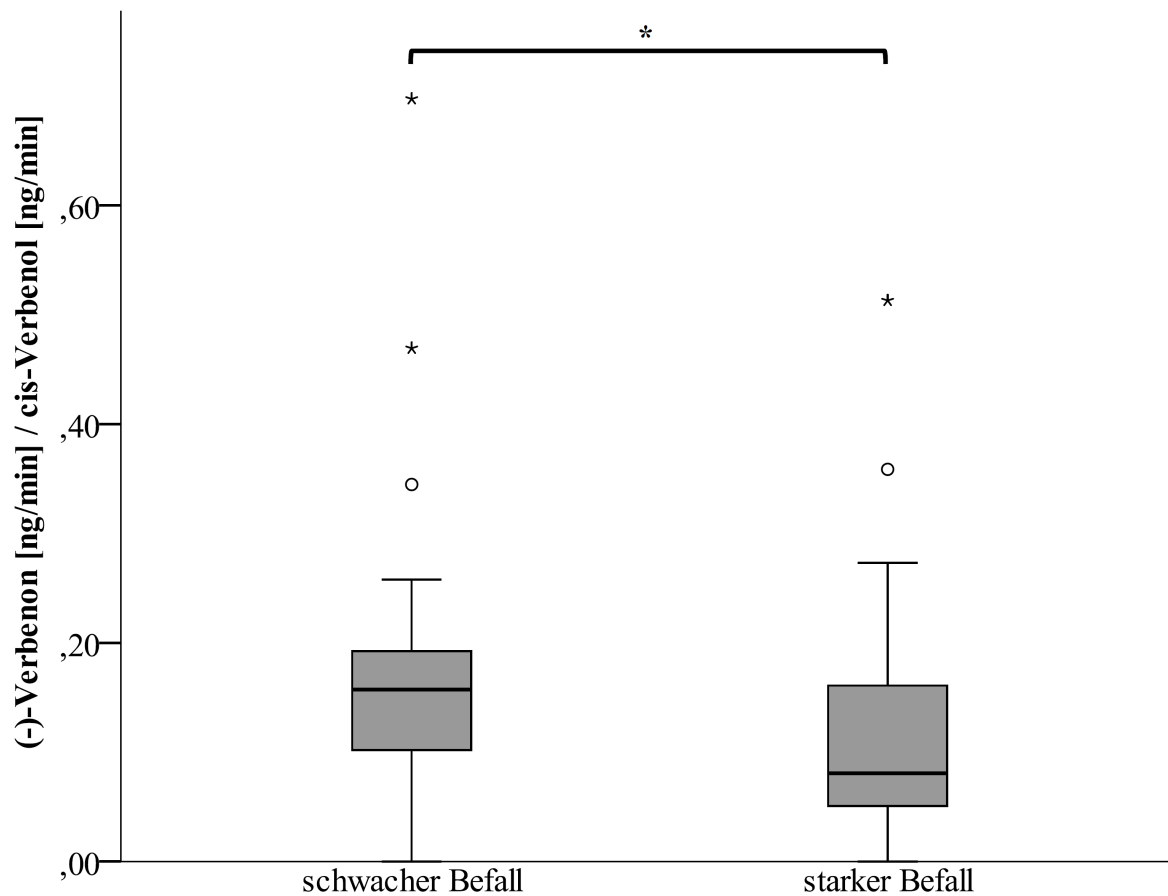


Abb. 31: Verhältnis (-)-Verbenon / cis-Verbenol (in ng/min) bei schwachem (\emptyset Rammelkammerzahl=6,2) und starkem (\emptyset Rammelkammerzahl=16,4) Befall. Dargestellt sind Median, obere und untere Quartile, Spannweite und Ausreißer (Wilcoxon Test, n=43) (* p<0,05).

Im zeitlichen Verlauf wurde für jeden der drei Analyten eine spezifische Emission festgestellt (Abb. 32 und Abb. 33). Im Vergleich zu cis-Verbenol und (-)-Verbenon wurde (-)- α -Pinen am meisten emittiert. Die Emissionsspannweite für (-)- α -Pinen reichte hier von 15-859ng/min bei schwachem Befall und bei starkem von 115-990ng/min. Bis zum 30.06.2010 stieg die Emission von (-)- α -Pinen in beiden Fällen an, brach jedoch in den folgenden Messungen ein (Abb. 32 und Abb. 33). Cis-Verbenol zeigte einen Emissionseinbruch zu Beginn der Larvenentwicklung, jedoch im Verlaufe der Studie stieg die cis-Verbenol-Emission an (Abb. 34). Die Emissionsspannweite von cis-Verbenol bewegte sich zwischen Werten unterhalb der Nachweisgrenze und 10ng/min bei schwachem und bis 14ng/min bei starkem Befall. (-)-Verbenon wurde im Vergleich zu (-)- α -Pinen und cis-Verbenol am wenigsten emittiert (Emissionsspannweite bei schwachem Befall bis 1ng/min und bei starkem Befall bis 3ng/min).

Ergebnisse:

In diesem Experiment wurden ebenfalls Lufttemperaturen zu den Messzeitpunkten aufgenommen. Im Unterschied zur vorherigen Studie wurden die Kambialtemperaturen mittels Thermologger, welche in die Rinde der Fichten eingebracht waren, gemessen (siehe 2.4.2). Somit konnten Gradtage und der Entwicklungsfortschritt der Brut unter der Rinde ermittelt werden. Sowohl Gradtage als auch Entwicklungsstadien zu den Messzeitpunkten sind in der Abb. 32 für schwachen Befall und in der Abb. 33 für starken Befall eingetragen.

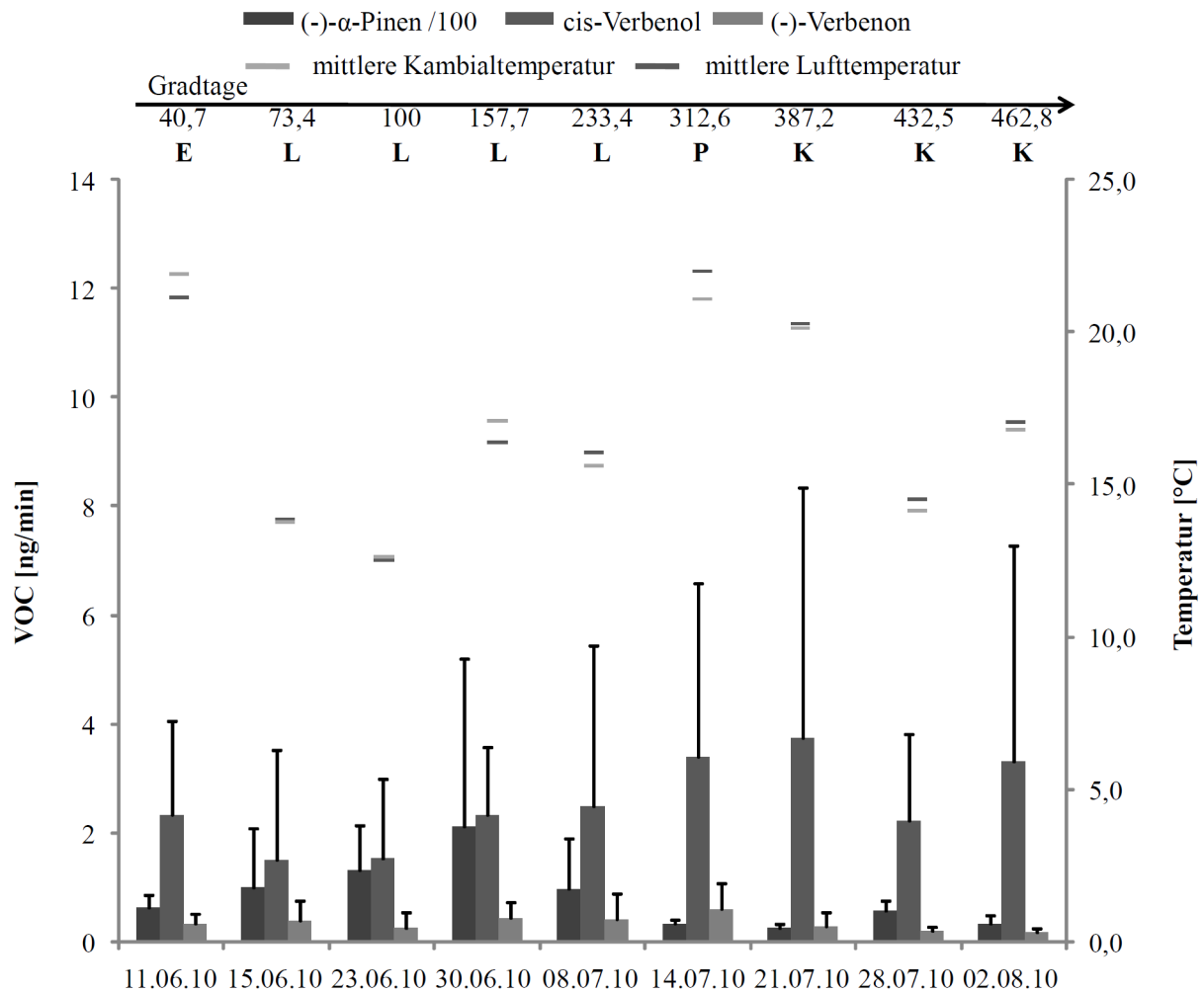


Abb. 32: Zeitlicher Verlauf emittierter VOCs (in ng/min) aus liegenden durch den Buchdrucker schwach befallenen Fichten (n=5). Die senkrechten Linien über den Säulen markieren die Standardabweichung. Mittlere Luft- und Kambialtemperaturen an den jeweiligen Probenahmetagen sind durch kurze Striche über den Säulen dargestellt. Der horizontale Pfeil symbolisiert die Temperatursumme. Die genannten Zahlen markieren die zu den Messzeitpunkten jeweils erreichten Gradtage. Unterhalb der Gradtage sind die zu den Messzeitpunkten erreichten Entwicklungsstadien der Brut unter der Rinde dargestellt (E = Ei, L = Larve, P = Puppe, K = Käfer).

Ergebnisse:

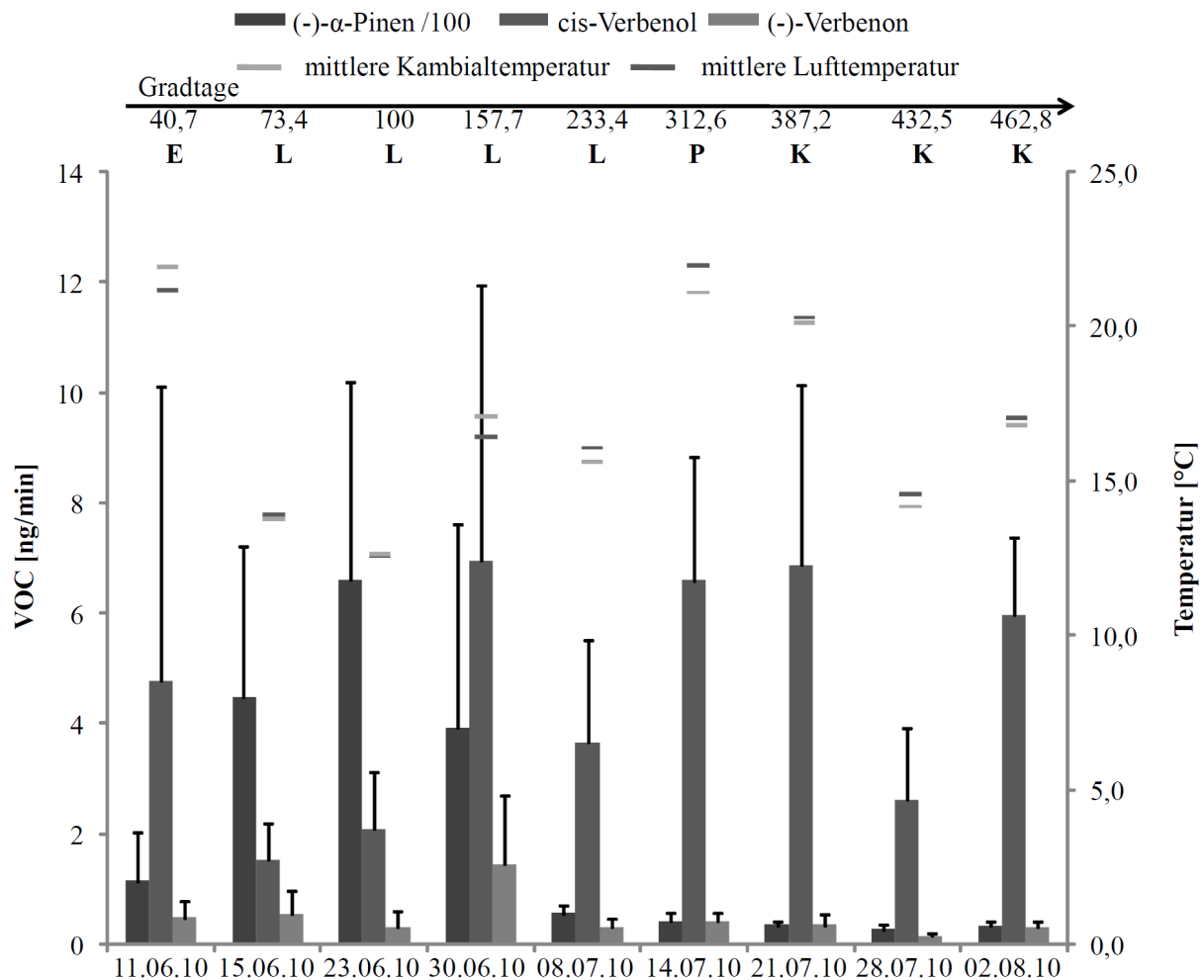


Abb. 33: Zeitlicher Verlauf emittierter VOCs (in ng/min) aus liegenden durch den Buchdrucker stark befallenen Fichten (n=5). Die senkrechten Linien über den Säulen markieren die Standardabweichung. Mittlere Luft- und Kambialtemperaturen an den jeweiligen Probenahmetagen sind durch kurze Striche über den Säulen dargestellt. Der horizontale Pfeil symbolisiert die Temperatursumme. Die genannten Zahlen markieren die zu den Messzeitpunkten jeweils erreichten Gradtage. Unterhalb der Gradtage sind die zu den Messzeitpunkten erreichten Entwicklungsstadien der Brut unter der Rinde dargestellt (E = Ei, L = Larve, P = Puppe, K = Käfer).

Der Faktor „Tage nach Befall“ hatte in dieser Studie einen Effekt auf (-)-α-Pinen bei schwachem und starkem Befall und auf cis-Verbenol bei starkem Befall (Tab. 6). Mit wachsendem Abstand zwischen Befalls- und Messzeitpunkt sank die Emission von (-)-α-Pinen, während diejenige von cis-Verbenol in der zweiten Hälfte der Untersuchungszeit wieder deutlich anstieg, entgegengesetzt der Erwartung, dass die Emission von cis-Verbenol wegen Mangels an Vorstufe ((-)-α-Pinen) ebenfalls sinken würde (Abb. 34). Bei starkem Befall konnte für cis-Verbenol ein Anstieg der Emission bei ansteigender Kambialtemperatur nachgewiesen werden. Entgegen der gängigen Meinung, dass die VOC-Emission bei steigender Temperatur zunimmt, nahm für (-)-α-Pinen die Emission ab. Mittels Bastproben,

Ergebnisse:

welche zu jedem Messzeitpunkt genommen wurden, konnte die jeweilige Menge an (-)- α -Pinen pro mg Bast (Trockengewicht) festgestellt werden (siehe 2.4.2), welche sich im zeitlichen Verlauf jedoch nicht signifikant veränderte (siehe Abb. 35). Daher konnte keine Korrelation zwischen dem (-)- α -Pinengehalt im Bast und der Emission der Zielanalyten festgestellt werden (siehe Tab. 6).

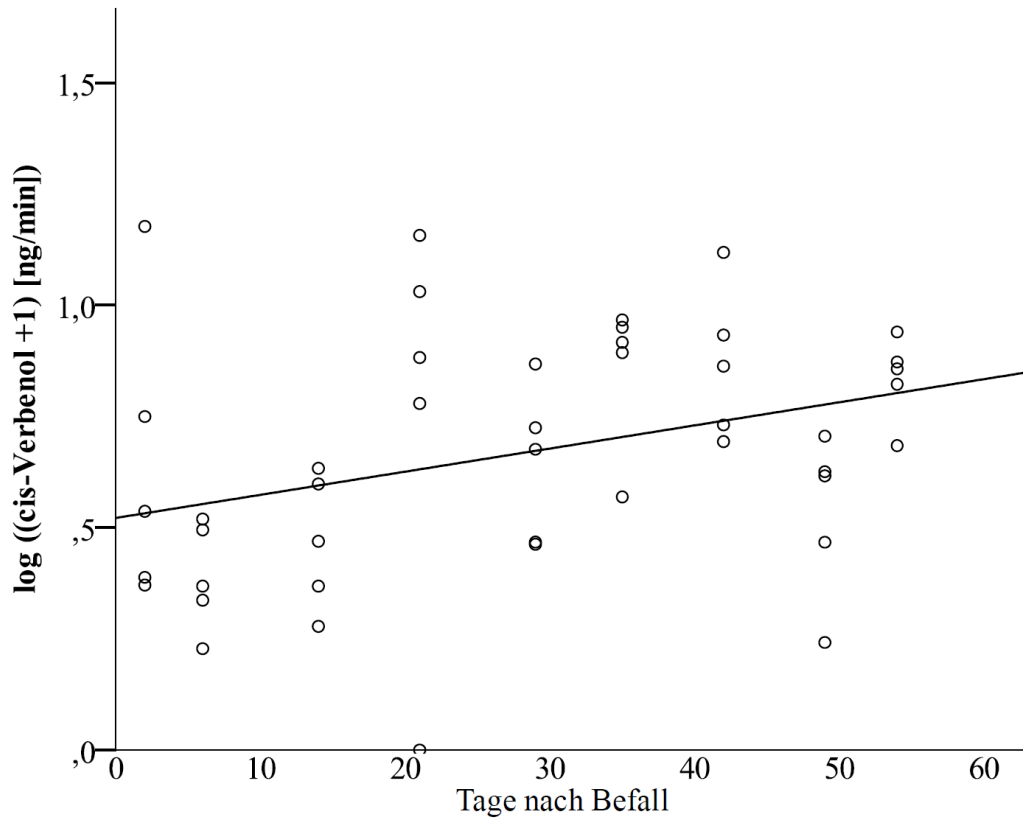


Abb. 34: Lineare Regression von „Tage nach Befall“ und cis-Verbenol (in ng/min +1 durch log transformiert) bei starkem Befall ($r^2=0,12$, $p=0,021$).

Ergebnisse:

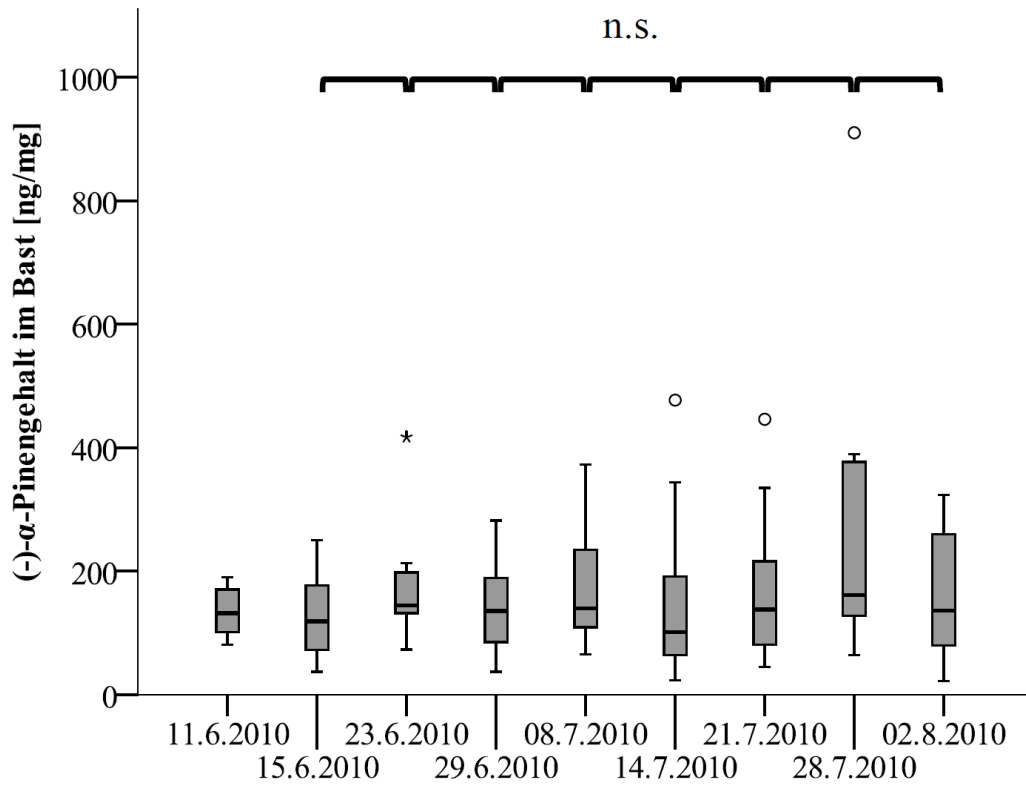


Abb. 35: Zeitlicher Verlauf gemessener (-)- α -Pinenkonzentrationen aus Baststanzen (in ng pro mg Trockengewicht) unbefallener Regionen der Versuchsbäume aus dem Versuch, der im Jahre 2010 auf dem Geißberg im Bayerischen Wald durchgeführt wurde (siehe 2.4.2). Dargestellt sind Median, obere und untere Quartile, Spannweite und Ausreißer. Die Klammern verbinden verglichene Datenpaare (Friedman ANOVA) (n.s.=nicht signifikant).

Ergebnisse:

Tab. 6: Übersicht der Regressionsanalyse bezüglich des Effekts der Faktoren „Tage nach Befall“, „Kambialtemperatur“ und „(-)- α -Pinengehalt im Bast“ auf die Emission von (-)- α -Pinen, cis-Verbenol und (-)-Verbenon jeweils bei schwachem und starkem Befall.

Befallsstärke	Faktor	Variable	r ²	p	Steigung der Regressionsgeraden
schwach	Tage nach Befall	(-)- α -Pinen	0,11	0,030	negativ
schwach	Tage nach Befall	cis-Verbenol	0,04	0,175	
schwach	Tage nach Befall	(-)-Verbenon	0,03	0,259	
schwach	Kambialtemperatur	(-)- α -Pinen	0,09	0,045	negativ
schwach	Kambialtemperatur	cis-Verbenol	0,06	0,103	
schwach	Kambialtemperatur	(-)-Verbenon	0,03	0,294	
schwach	(-)- α -Pinen im Bast	(-)- α -Pinen	0,00	0,758	
schwach	(-)- α -Pinen im Bast	cis-Verbenol	0,00	0,795	
schwach	(-)- α -Pinen im Bast	(-)-Verbenon	0,03	0,307	
stark	Tage nach Befall	(-)- α -Pinen	0,37	<0,001	negativ
stark	Tage nach Befall	cis-Verbenol	0,12	0,021	positiv
stark	Tage nach Befall	(-)-Verbenon	0,07	0,085	negativ
stark	Kambialtemperatur	(-)- α -Pinen	0,19	0,003	negativ
stark	Kambialtemperatur	cis-Verbenol	0,21	0,002	positiv
stark	Kambialtemperatur	(-)-Verbenon	0,01	0,446	
stark	(-)- α -Pinen im Bast	(-)- α -Pinen	0,00	0,926	
stark	(-)- α -Pinen im Bast	cis-Verbenol	0,05	0,150	
stark	(-)- α -Pinen im Bast	(-)-Verbenon	0,02	0,373	

Wie schon in der vorherigen Untersuchung wurde auch hier eine Korrelation zwischen der Emissionen von cis-Verbenol und (-)-Verbenon erwartet. Hierbei wurde bei schwachem Befall eine signifikante Beziehung der beiden Zielanalyten während des Larven- und des Puppenstadiums der Brut sowie bei der Analyse der Emissionsbeziehung über den gesamten Versuchszeitraum hinweg festgestellt (siehe Tab. 7). Die Emission von (-)-Verbenon stieg bei einer Steigerung der cis-Verbenol-Emission an.

Bei starkem Befall wurde solch ein Effekt nur an drei Messtagen (15.06.2010, 23.06.2010 und 30.06.2010) nachgewiesen. Die Brut befand sich an diesen drei Messtagen im Larvenstadium (siehe Abb. 33). Bei der Analyse der Emissionsbeziehung der beiden Analyten über den gesamten Versuchszeitraum hinweg, konnte eine Korrelation gefunden werden (siehe Tab. 7).

Ergebnisse:

Tab. 7: Übersicht der Regressionsanalyse zwischen emittiertem cis-Verbenol und (-)-Verbenon pro Probenahmetag und während des gesamten Probezeitraums bei starkem und schwachem Befall.

Probenahmetag	Befallsstärke	Faktor	Variable	r²	p
11.06.2010	schwach	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,51	0,176
15.06.2010	schwach	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,82	0,035
23.06.2010	schwach	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,98	0,001
30.06.2010	schwach	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,97	0,002
08.07.2010	schwach	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,95	0,005
14.07.2010	schwach	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,96	0,018
21.07.2010	schwach	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,65	0,099
28.07.2010	schwach	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,00	0,961
02.08.2010	schwach	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,36	0,282
Probezeitraum gesamt	schwach	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,51	<0,001
11.06.2010	stark	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,64	0,105
15.06.2010	stark	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,92	0,009
23.06.2010	stark	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,83	0,032
30.06.2010	stark	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,84	0,028
08.07.2010	stark	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,55	0,154
14.07.2010	stark	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,59	0,132
21.07.2010	stark	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,62	0,114
28.07.2010	stark	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,65	0,099
02.08.2010	stark	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,58	0,133
Probezeitraum gesamt	stark	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,32	<0,001

3.1.3 Zeitliche Variabilität der VOC-Emission im Befallsverlauf unter Laborbedingungen

In einem dritten Experiment wurde die Variabilität der Emission von (-)- α -Pinen, cis-Verbenol und (-)-Verbenon aus Brutsystemen im zeitlichen Verlauf unter Laborbedingungen untersucht. Äußerliche Störfaktoren wie schwankende Temperaturen und Niederschlag sollten vermieden werden. Auch in diesem Versuch interessierte eine mögliche Beeinflussung der Emissionen von (-)-Verbenon durch die von cis-Verbenol. In diesem Experiment wurden Rindenstücke mit einer Fläche von 20*20cm in sogenannten Sandwiches (Abb. 16) künstlich besiedelt und mit dem mobilen Closed-Loop VOC-Sammelsystem (Abb. 17) beprobt.

Ergebnisse:

Auch unter Laborbedingungen konnte für jeden der drei Zielanalyten ein spezifischer zeitlicher Emissionsverlauf festgestellt werden. (-)- α -Pinen, welches anfangs die höchste Emission aufwies (8-102ng/min), zeigte bis zum Versuchsende einen stetigen Rückgang der Emission. Bei cis-Verbenol (Emissionsspannweite bis 27ng/min) konnte während der Konstruktion von Rammelkammern und Muttergängen durch parentale Käfer eine erhöhte Emission beobachtet werden. Während der Entwicklung der Brut im Ei- und Larvenstadium ging die cis-Verbenol-Emission zurück, stieg jedoch gegen Ende des Versuchs stark an. Die Brut hatte zu diesem Zeitpunkt größtenteils das Käferstadium erreicht. (-)-Verbenon wurde bereits zu Versuchsbeginn in geringen Mengen emittiert (Emissionsspannweite bis 1ng/min). Im Verlauf der Studie nahm die (-)-Verbenon-Emission kontinuierlich ab (Abb. 36). In diesem Experiment wurde im Vergleich zu der vorangegangenen Untersuchung im Freiland die geringste Besiedlungsdichte mit durchschnittlich 0,52 Brutsystemen pro 100cm² erreicht.

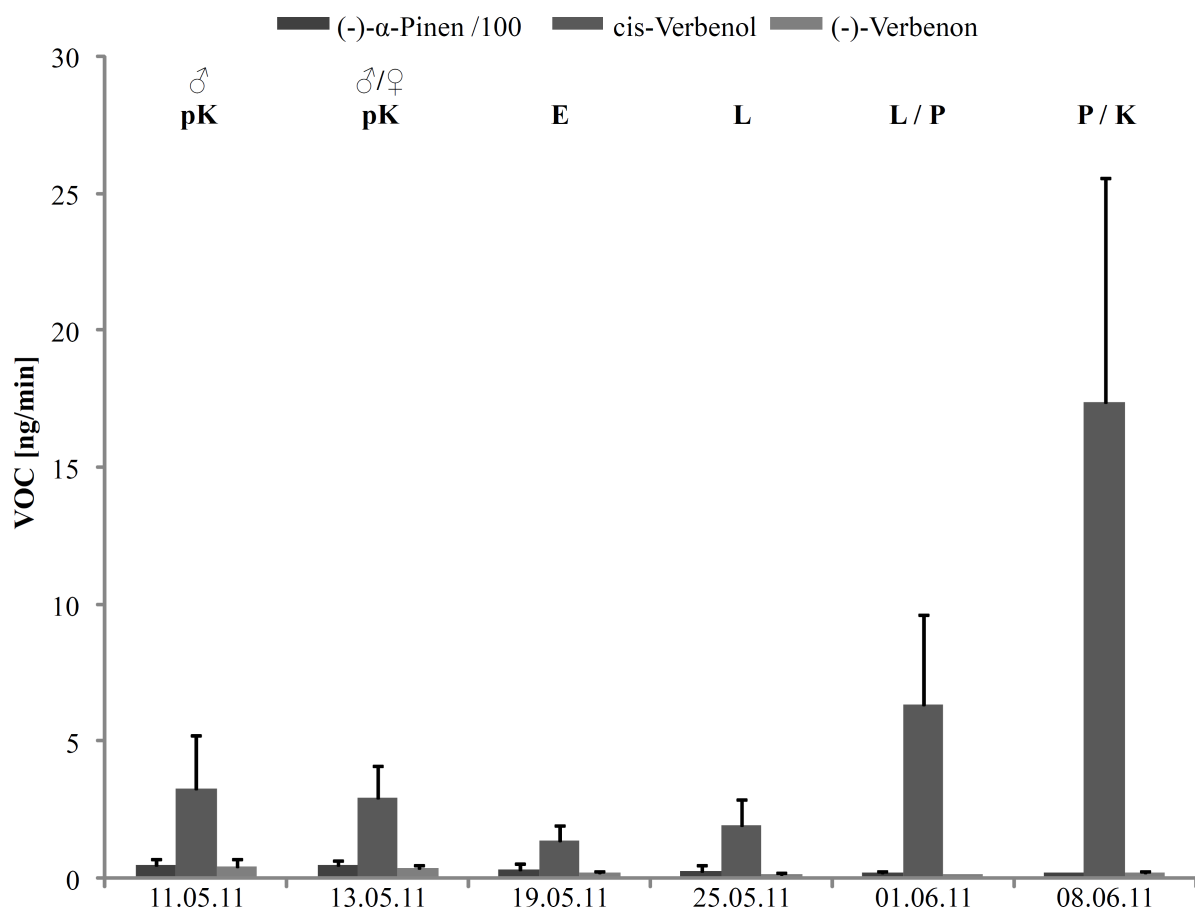


Abb. 36: Zeitlicher Verlauf emittierter VOCs (in ng/min) aus künstlich besiedelten Sandwiches (n=16). Die senkrechten Linien über den Säulen markieren die Standardabweichung. Oben in der Grafik sind die zu den Messzeitpunkten erreichten Entwicklungsstadien der Brut dargestellt (pK = parentale Käfer, E = Ei, L = Larve, P = Puppe, K = Käfer).

Ergebnisse:

Der Faktor „Tage nach Befall“ hatte einen signifikanten Effekt auf alle untersuchten VOCs (Tab. 8). Die Emission von (-)- α -Pinen und (-)-Verbenon nahm mit der Zeit ab, wohingegen die Emission von cis-Verbenol anstieg (Abb. 37).

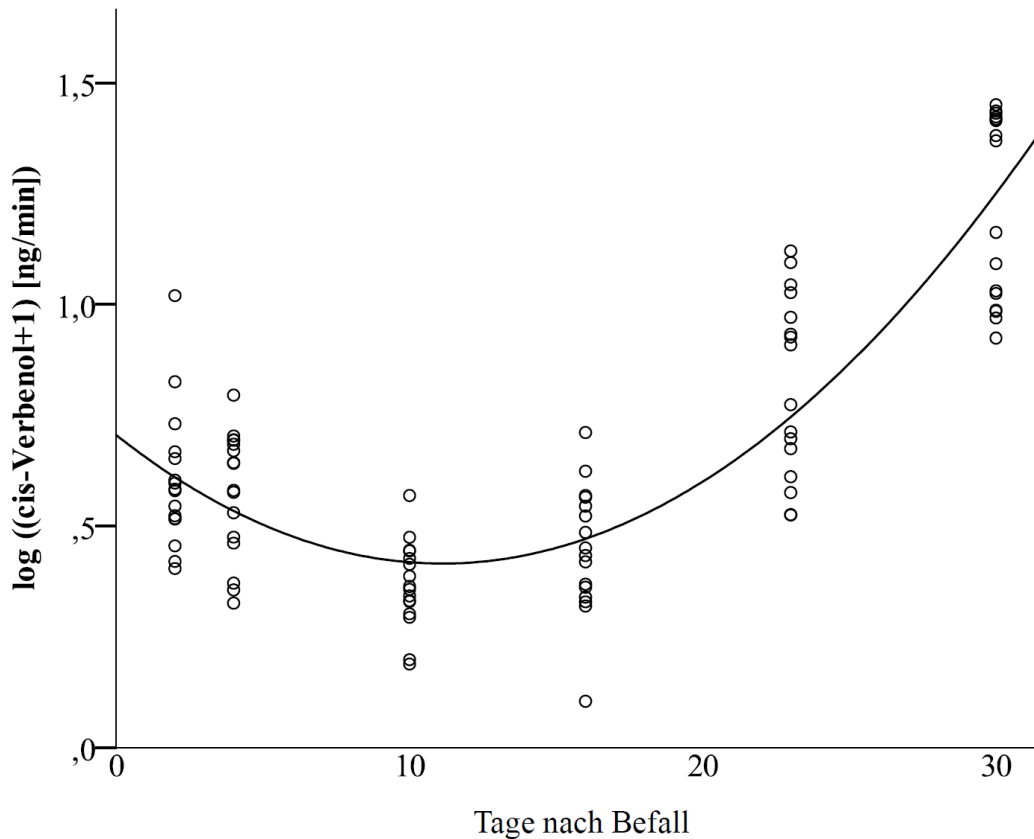


Abb. 37: Quadratische Regression von „Tage nach Befall“ und cis-Verbenol (in ng/min +1 durch log transformiert) ($r^2=0,74$, $p<0,001$).

Tab. 8: Übersicht der Regressionsanalyse bezüglich des Effekts des Faktors „Tage nach Befall“ auf die Emission von (-)- α -Pinen, cis-Verbenol und (-)-Verbenon.

Faktor	Variable	r^2	p	Steigung der Regressionsgeraden
Tage nach Befall	(-)- α -Pinen	0,43	<0,001	negativ
Tage nach Befall	cis-Verbenol	0,74	<0,001	-
Tage nach Befall	(-)-Verbenon	0,27	<0,001	negativ

Bei der Analyse der möglichen Korrelation zwischen der cis-Verbenol-Emission und der (-)-Verbenon-Emission konnte, bis auf den 01.06.2011, ein Effekt an allen Messtagen nachgewiesen werden. Auch hier führte eine Steigerung der cis-Verbenol-Emission zu einer gesteigerten Emission von (-)-Verbenon. Die Analyse über den gesamten Versuchszeitraum hinweg ergab kein signifikantes Ergebnis (siehe Tab. 9).

Ergebnisse:

Tab. 9: Übersicht der Regressionsanalyse zwischen emittiertem cis-Verbenol und (-)-Verbenon pro Probenahmetag und während des gesamten Probezeitraums unter Laborbedingungen.

Probenahmetag	Faktor	Variable	r²	p
11.05.2011	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,84	< 0,001
13.05.2011	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,84	< 0,001
19.05.2011	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,74	< 0,001
25.05.2011	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,79	< 0,001
01.06.2011	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,06	0,343
08.06.2011	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,28	0,035
Probezeitraum gesamt	cis-Verbenol	(-)-Verbenon	0,02	0,214

3.2 Tracheale VOC-Emission

Durch die Untersuchung der räumlichen Ausbreitung von emittierten VOCs konnte die Existenz von (-)- α -Pinen in der Waldluft nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die früheren Beobachtungen von Janson (1993) und zeigt, dass *I. typographus* auch während seines Dispersionsfluges einer (-)- α -Pinenatmosphäre ausgesetzt ist. Aufgrund dieses Tatbestandes und der Tatsache, dass tracheal aufgenommenes (-)- α -Pinen zu cis-Verbenol oxidiert wird, wurde die Hypothese aufgestellt, dass cis-Verbenol im Zuge der notwendigen Respiration auch wieder freigesetzt wird. Dies würde bedeuten, *I. typographus* könnte Pheromonkomponenten bereits während des Fluges und vor dem Einbohren abgeben. In Laborexperimenten sollte zunächst geprüft werden, ob *I. typographus* in der Lage ist, cis-Verbenol ohne Fraß an einem Wirt freizusetzen. Als Bestandteil des Pheromonbouquets des Buchdruckers und als Oxidationsprodukt von cis-Verbenol sollte zusätzlich die Freisetzung von (-)-Verbenon untersucht werden.

3.2.1 Tracheale Emission von cis-Verbenol und (-)-Verbenon

Zur Überprüfung der Hypothese, dass *I. typographus* in der Lage ist, sowohl cis-Verbenol als auch (-)-Verbenon über das Tracheensystem zu exhaliieren, wurden die Versuchstiere (n=147) individuell in einer künstlichen Atmosphäre der cis-Verbenol-Vorstufe (-)- α -Pinen mit einer Konzentration von 0,48 μ l/ml Gefäßvolumen für 24h inkubiert. Mit Ausnahme der Zugabe von (-)- α -Pinen war die Behandlung der Kontrollindividuen (n=145) identisch (2.5.1). Anschließend wurden die Exhalationsprodukte der Käfer mit einem Closed-Loop VOC-Sammelsystem (Abb. 13) in Adsorptionsröhrchen gespeichert und per Thermodesorption und GC-MS analysiert.

Ergebnisse:

Ein erster Auswerteschritt zeigt die Anzahl der Käfer, die cis-Verbenol (Abb. 38) bzw. (-)-Verbenon (Abb. 39) oberhalb der Nachweisgrenze freisetzen. Beide Analyten konnten auch bei unbehandelten Kontrollkäfern festgestellt werden. Allerdings war die Anzahl an cis-Verbenol und (-)-Verbenon exhaliierenden Käfern bei Individuen höher, welche zuvor mit (-)- α -Pinen inkubiert worden waren (Chi-Quadrat-Homogenitätstest bei cis-Verbenol: $\chi^2=14,72$, $p<0,001$, $n=292$; Abb. 38 und bei (-)-Verbenon: $\chi^2=23,11$, $p<0,001$, $n=292$; Abb. 39). Hierbei ist zu beachten, dass der Anteil an behandelten Individuen, bei denen die emittierten VOC-Mengen unterhalb der Nachweisgrenze blieben, bei der Analyse der cis-Verbenol-Exhalation geringer war als bei der Analyse zur (-)-Verbenon-Exhalation. Im ersten Fall wurden bei 27 von 147 behandelten Individuen VOC-Mengen unterhalb der Nachweisgrenze nachgewiesen, im zweiten Fall waren es 56 von 147.

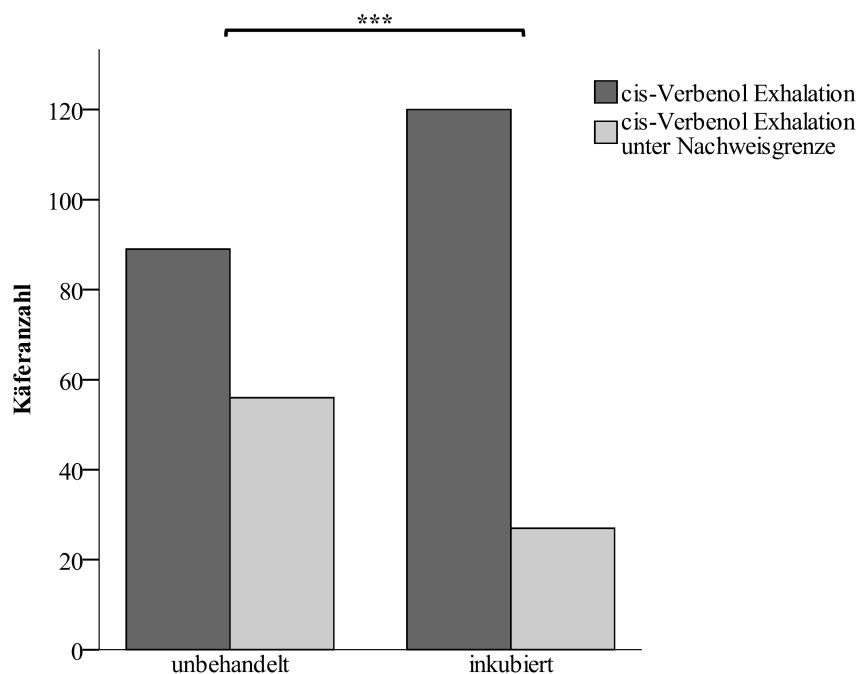


Abb. 38: Anzahl an Individuen, die cis-Verbenol exhalierten, und Individuen, deren cis-Verbenol Exhalation unterhalb der Nachweisgrenze lag, im Vergleich von unbehandelten und in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre inkubierten Buchdruckern (Chi-Quadrat-Homogenitätstest) (***) $p<0,001$).

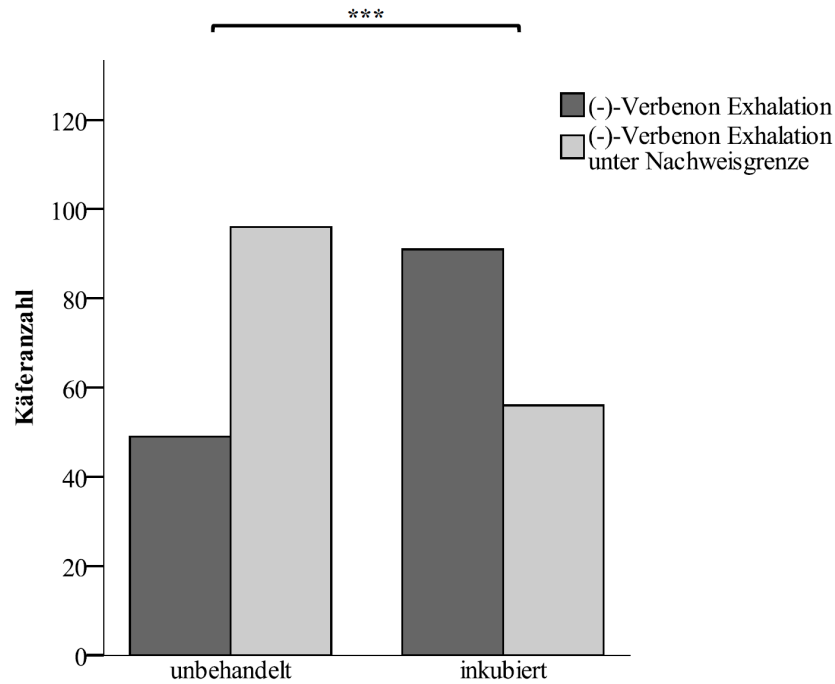


Abb. 39: Anzahl an Individuen, die (-)-Verbenon exhalierten, und Individuen, deren (-)-Verbenon Exhalation unterhalb der Nachweisgrenze lag, im Vergleich von unbehandelten und in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre inkubierten Buchdruckern (Chi-Quadrat-Homogenitätstest) (*) $p < 0,001$).**

Nachdem sich grundsätzlich die Möglichkeit der trachealen Emission von cis-Verbenol und (-)-Verbenon nach trachealer Aufnahme von (-)- α -Pinen herausstellte, wurde als zusätzliche Absicherung die cis-Verbenol bzw. (-)-Verbenon-Produktion nach trachealer Aufnahme von (-)- α -Pinen durch Extraktion der Käfer geprüft. Hierzu wurden die Versuchstiere, nachdem die Exhalationsprodukte gesammelt worden waren, in Hexan extrahiert und die Extrakte per GC-MS hinsichtlich des VOC-Gehalts überprüft. Der Anteil an cis-Verbenol enthaltenden Extrakten war bei Extrakten inkubierter Käfer höher (105 Extrakte) als bei Extrakten unbehandelter Käfer (11 Extrakte) (Chi-Quadrat-Homogenitätstest: $\chi^2=95,53$, $p < 0,001$, $n=235$, Abb. 40). Somit konnte die cis-Verbenol Produktion nach trachealer Aufnahme von (-)- α -Pinen nachgewiesen werden. Die (-)-Verbenon Produktion nach Inkubation mit (-)- α -Pinen wurde ebenfalls nachgewiesen (Chi-Quadrat-Homogenitätstest: $\chi^2=80,62$, $p < 0,001$, $n=235$, Abb. 41). Hier wurden in 102 Extrakten von inkubierten Individuen (-)-Verbenon nachgewiesen, wobei bei unbehandelten Käfern in nur 14 Extrakten (-)-Verbenon nachzuweisen war.

Ergebnisse:

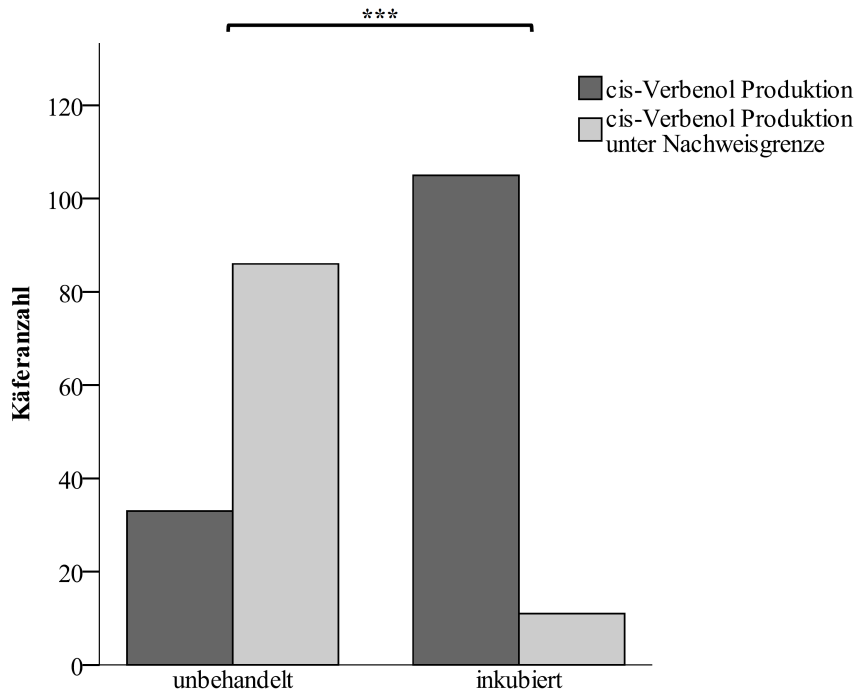


Abb. 40: Anzahl an Individuen, die cis-Verbenol produzierten, und Individuen, deren cis-Verbenol Produktion unterhalb der Nachweisgrenze lag, im Vergleich von unbehandelten und in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre inkubierten Buchdruckern (Chi-Quadrat-Homogenitätstest) (***) $p < 0,001$).

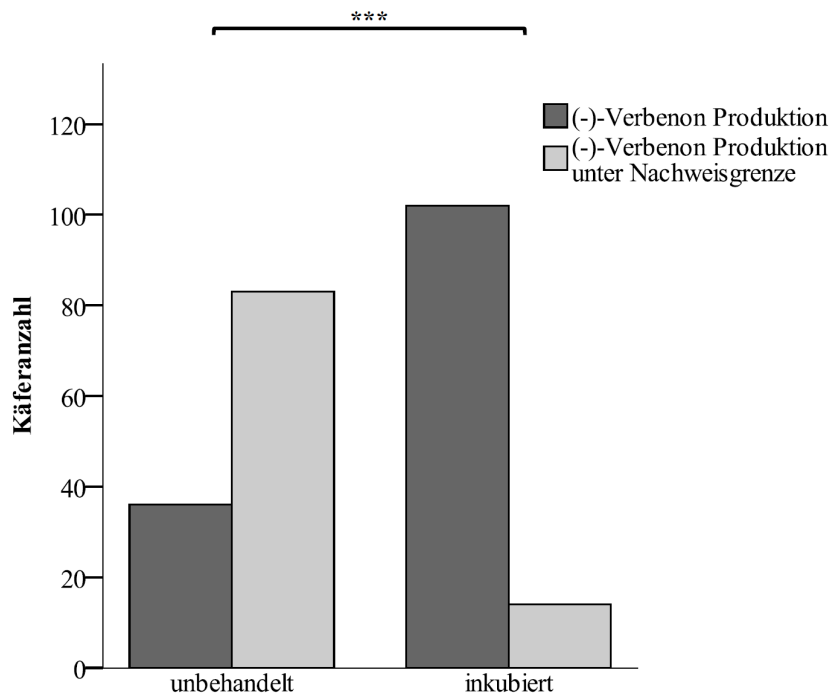


Abb. 41: Anzahl an Individuen, die (-)-Verbenon produzierten, und Individuen, deren (-)-Verbenon Produktion unterhalb der Nachweisgrenze lag, im Vergleich von unbehandelten und in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre inkubierten Buchdruckern (Chi-Quadrat-Homogenitätstest) (***) $p < 0,001$).

Ergebnisse:

Die detaillierte gaschromatographische Analyse der Exhalationsprodukte von Buchdruckern ergab weiterhin, dass beide Geschlechter zur Exhalation von cis-Verbenol und (-)-Verbenon in der Lage sind (Abb. 42 und Abb. 43). Besonders auffällig waren hier inkubierte männliche Individuen, welche die größten Mengen an cis-Verbenol mit Maximalwerten von 34000ng exhalierten. Insgesamt wurde eine hohe Variabilität der individuellen VOC-Freisetzung beobachtet. Sie betrug auf unterschiedlichen Niveaus 2-3 Zehnerpotenzen unabhängig von der Behandlungsvariante und dem Geschlecht. Im Vergleich der exhalierten cis-Verbenolmengen zwischen unbehandelten und inkubierten Individuen, wurden größere Mengen bei inkubierten Käfern gemessen (ANOVA: $F=44,31$, $df=1$, $p<0,001$, $n=209$, LSD post hoc Test; Abb. 42). Die exhalierten (-)-Verbenonmengen unterschieden sich nicht (ANOVA: $F=0,8$, $df=1$, $p=0,373$, $n=137$; Abb. 43).

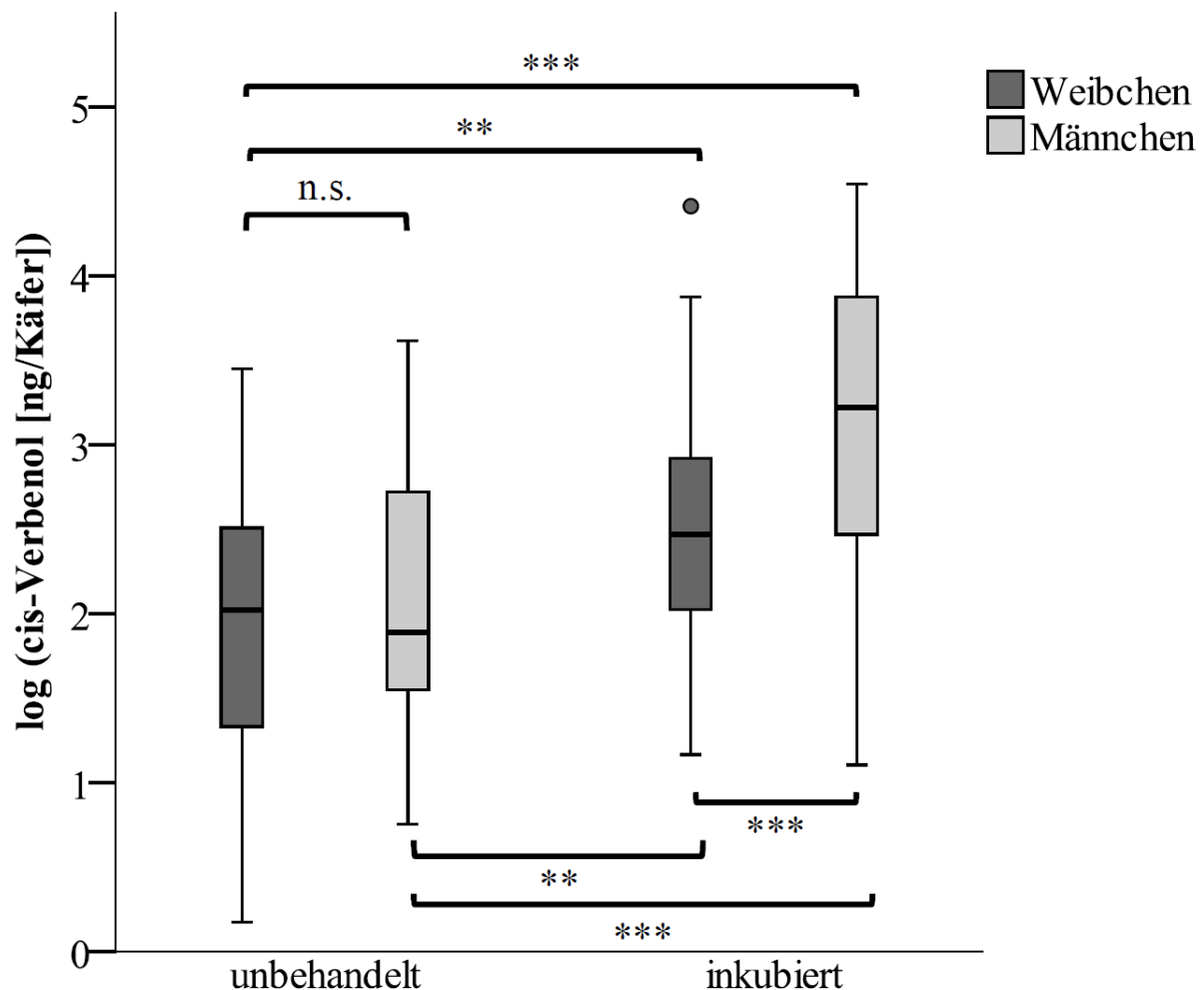


Abb. 42: Mengen an exhaliertem cis-Verbenol (in ng pro Käfer durch log transformiert) von unbehandelten und inkubierten Käfern. Dargestellt sind Median, obere und untere Quartile, Spannweite und Ausreißer. Die Klammern verbinden verglichene Datenpaare (ANOVA, LSD post hoc Test) (n.s.=nicht signifikant; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

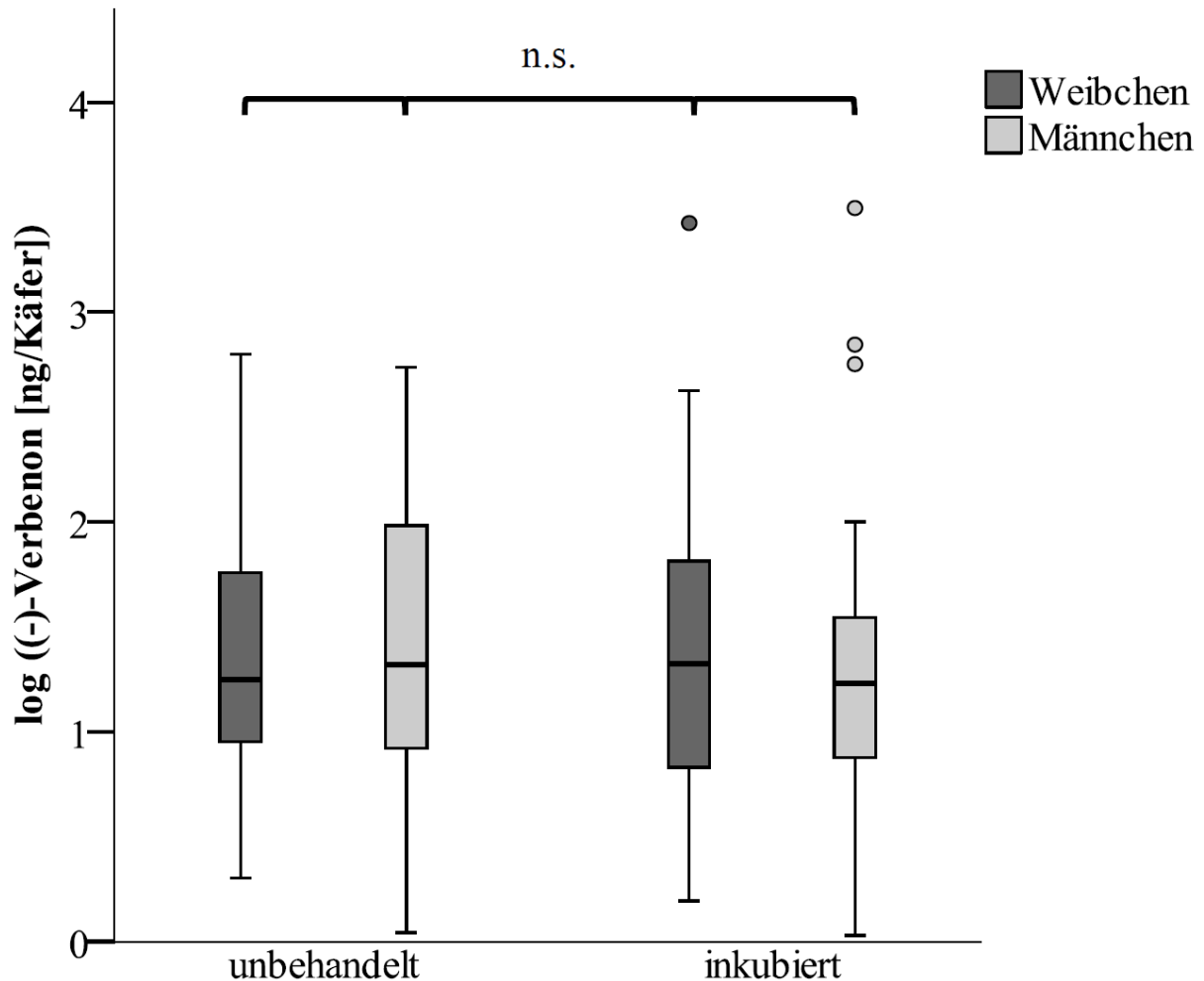


Abb. 43: Mengen an exhalierem (-)-Verbenon (in ng pro Käfer durch log transformiert) von unbehandelten und inkubierten Käfern. Dargestellt sind Median, obere und untere Quartile, Spannweite und Ausreißer. Die Klammern verbinden verglichene Datenpaare (ANOVA, LSD post hoc Test) (n.s.=nicht signifikant).

In Extrakten unbehauelter und inkubierter Käfer wurde ebenfalls sowohl cis-Verbenol als auch (-)-Verbenon bei beiden Geschlechtern gefunden (Abb. 44). Wie schon bei der Analyse der Exhalate festgestellt wurde, waren die gemessenen cis-Verbenolmengen in Extrakten der Käfer bei inkubierten Individuen größer (Kruskal-Wallis Test: $H=58,51$, $df=3$, $p<0,001$, $n=138$, Dunn-Bonferroni post hoc Test). Im Gegensatz zu der Analyse der Exhalate konnte bei der Extraktanalyse zur Produktion von (-)-Verbenon ein deutlicher Effekt der Inkubation mit (-)- α -Pinen gezeigt werden. In Extrakten inkubierter Käfer wurden signifikant höhere Mengen an (-)-Verbenon festgestellt (Kruskal-Wallis Test: $H=54,72$, $df=3$, $p<0,001$, $n=138$, Dunn-Bonferroni post hoc Test).

Ergebnisse:

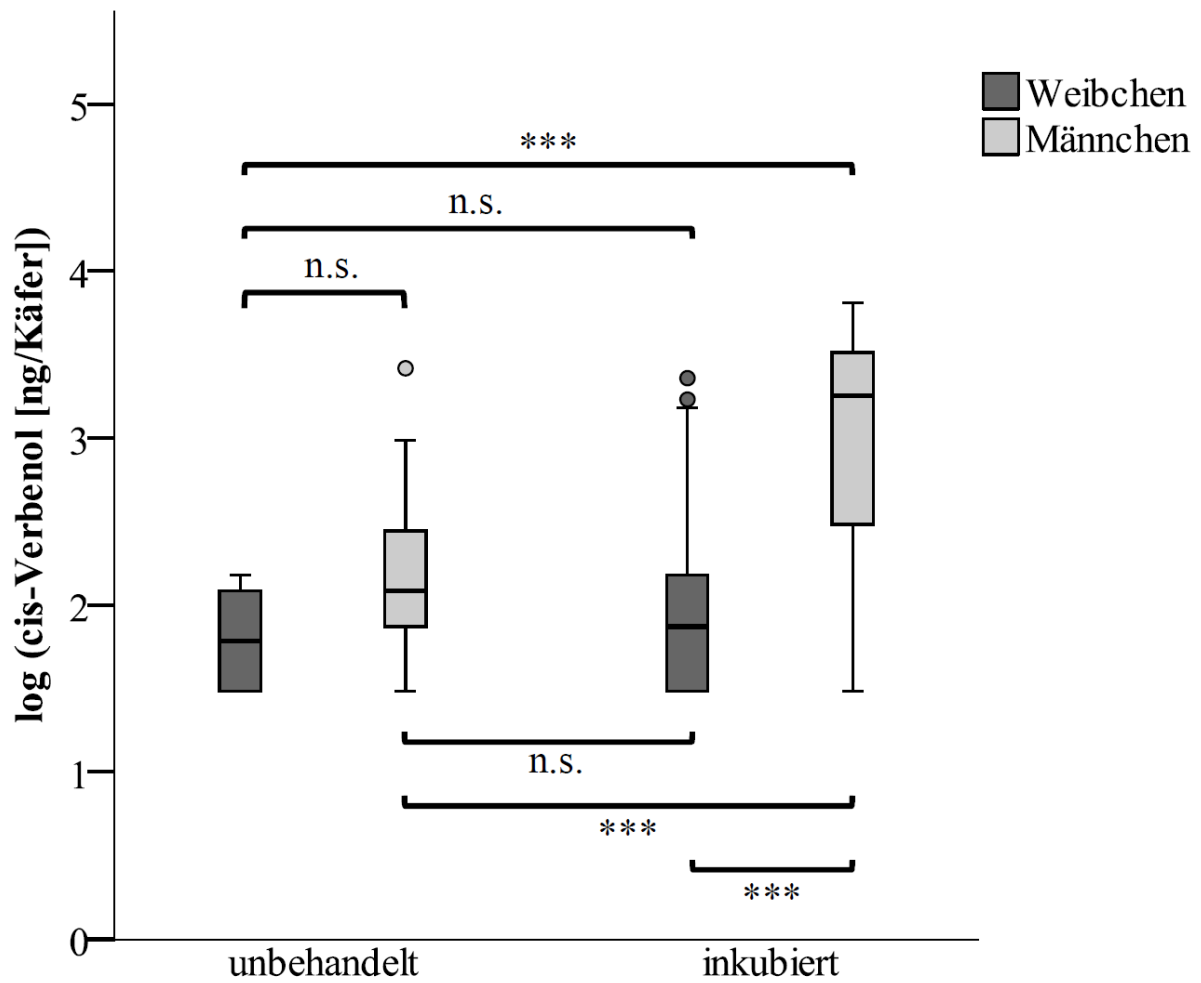


Abb. 44: Mengen an cis-Verbenol (in ng pro Käfer durch log transformiert) in Extrakten von unbehandelten und inkubierten Käfern. Dargestellt sind Median, obere und untere Quartile, Spannweite und Ausreißer. Die Klammern verbinden verglichene Datenpaare (Kruskal-Wallis Test, Dunn-Bonferroni post hoc Test) (n.s.=nicht signifikant; *** p<0,001).

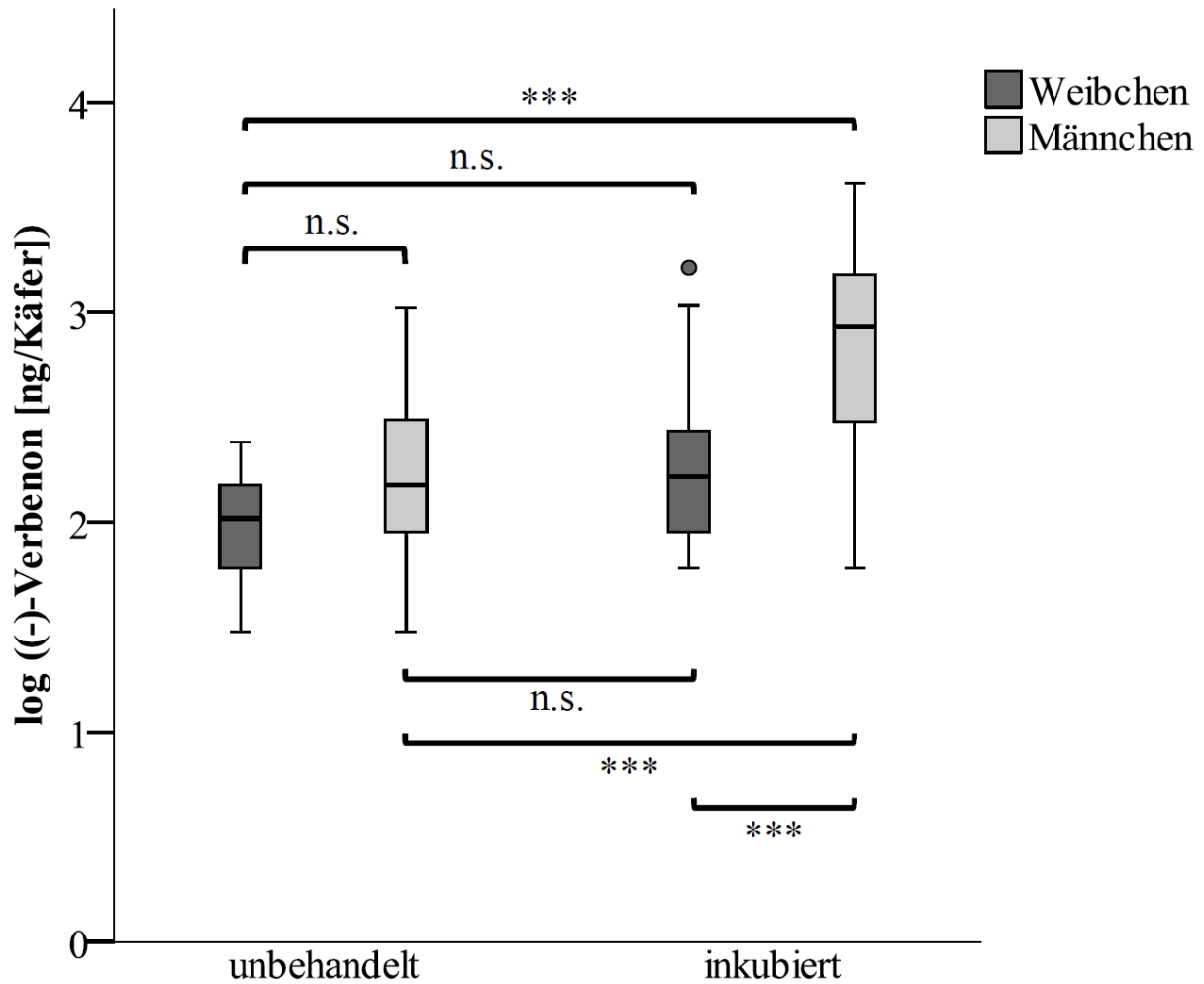


Abb. 45: Mengen an (-)-Verbenon (in ng pro Käfer durch log transformiert) in Extrakten von unbehandelten und inkubierten Käfern. Dargestellt sind Median, obere und untere Quartile, Spannweite und Ausreißer. Die Klammern verbinden verglichene Datenpaare (Kruskal-Wallis Test, Dunn-Bonferroni post hoc Test) (n.s.=nicht signifikant; *** $p < 0,001$).

3.2.2 Pheromonproduktion toter Käfer

Die im vorherigen Versuch dargestellten Ergebnisse zeigten, dass der Buchdrucker insbesondere nach einer, aber auch ohne eine Vorbehandlung mit (-)- α -Pinen in der Lage ist, cis-Verbenol zu emittieren. Es ist jedoch nicht per se auszuschließen, dass cis-Verbenol durch mögliche Autoxidation und/oder durch die Aktivität von anhaftenden Mikroorganismen an der Oberfläche der Käfer entsteht. Es sollte daher geprüft werden, inwieweit für die Emission von cis-Verbenol Käfer mit intaktem Atmungs- und Enzymsystem notwendig sind. Hierzu wurden in der Kälte getötete Käfer in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre inkubiert und anschließend in Hexan gewaschen sowie extrahiert. Unbehandelte tote Kontrollindividuen dienten hier als Vergleich.

Ergebnisse:

Diese Experimente zeigten, dass eine Produktion von cis-Verbenol durch tote Käfer nicht möglich ist, bzw. unterhalb der Nachweisgrenze bleibt. Durch Waschung in Hexan konnte kein cis-Verbenol von der Käferoberfläche gelöst werden (Tab. 10). Auch in Käferextrakten wurde kein cis-Verbenol nachgewiesen (Tab. 11). Es konnte nur die zur Inkubation verwendete Vorstufe (-)- α -Pinen und in Extrakten bei fünf Individuen auch (-)-Verbenon festgestellt werden. Die Stichprobengröße betrug 20 bei einem Geschlechterverhältnis von 9 Männchen zu 11 Weibchen.

Tab. 10: Existenz der Zielanalyten (-)- α -Pinen, cis-Verbenol und (-)-Verbenon in Hexan-Proben nach Oberflächenwaschung unbehandelter und inkubierter Käfer

Waschung			
VOC	Behandlung	Anzahl produzierender Individuen	Konzentration [ng pro Käfer]
(-)- α -Pinen	unbehandelt	0	0
cis-Verbenol	unbehandelt	0	0
(-)-Verbenon	unbehandelt	0	0
(-)- α -Pinen	inkubiert	20	109-981
cis-Verbenol	inkubiert	0	0
(-)-Verbenon	inkubiert	0	0

Tab. 11: Existenz der Zielanalyten (-)- α -Pinen, cis-Verbenol und (-)-Verbenon in Hexan-Extrakten von unbehandelten und inkubierten Käfern

Extraktion			
VOC	Behandlung	Anzahl produzierender Individuen	Konzentration [ng pro Käfer]
(-)- α -Pinen	unbehandelt	1	82
cis-Verbenol	unbehandelt	0	0
(-)-Verbenon	unbehandelt	1	180
(-)- α -Pinen	inkubiert	20	1117-13297
cis-Verbenol	inkubiert	0	0
(-)-Verbenon	inkubiert	4	60-150

3.2.3 Attraktivität von Buchdruckern, die mit (-)- α -Pinen inkubiert wurden

Dieser Versuch sollte die Attraktivität von in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre inkubierten Buchdrucker auf Artgenossen überprüfen. Hierzu wurde der Effekt von inkubierten und unbehandelten Käfern (Lockkäfer) auf Wahlkäfer in zwei Wahlexperimenten

Ergebnisse:

getestet. Um einen Effekt der jeweils verwendeten Testarenen auf die Käfer auszuschließen, wurden Tests mit zwei unterschiedlichen Arenen durchgeführt. In beiden Tests konnte eine Präferenz der Wahlkäfer für inkubierte Lockkäfer festgestellt werden.

In einem ersten Experiment wurde der Effekt von Lockkäfern auf Wahlkäfer in einem Y-Rohr (Abb. 19) überprüft. Im Y-Rohr konnte gezeigt werden, dass die Käferzahl und damit die Menge an emittierten VOCs die anlockende Wirkung der Lockkäferkollektive beeinflusst (Abb. 46). Somit fiel die Entscheidung für inkubierte Lockkäfer nur bei einer Kollektivgröße von fünf Lockkäfern signifikant aus ($\chi^2=4.8$, $p=0,03$, $n=30$). Die beiden anderen Lockkäferkollektive mit einem und drei Lockkäfern zeigten keine signifikante anlockende Wirkung (ein Lockkäfer: $\chi^2=0,2$, $p=0,66$, $n=20$; drei Lockkäfer: $\chi^2=3,33$, $p=0,07$, $n=30$).

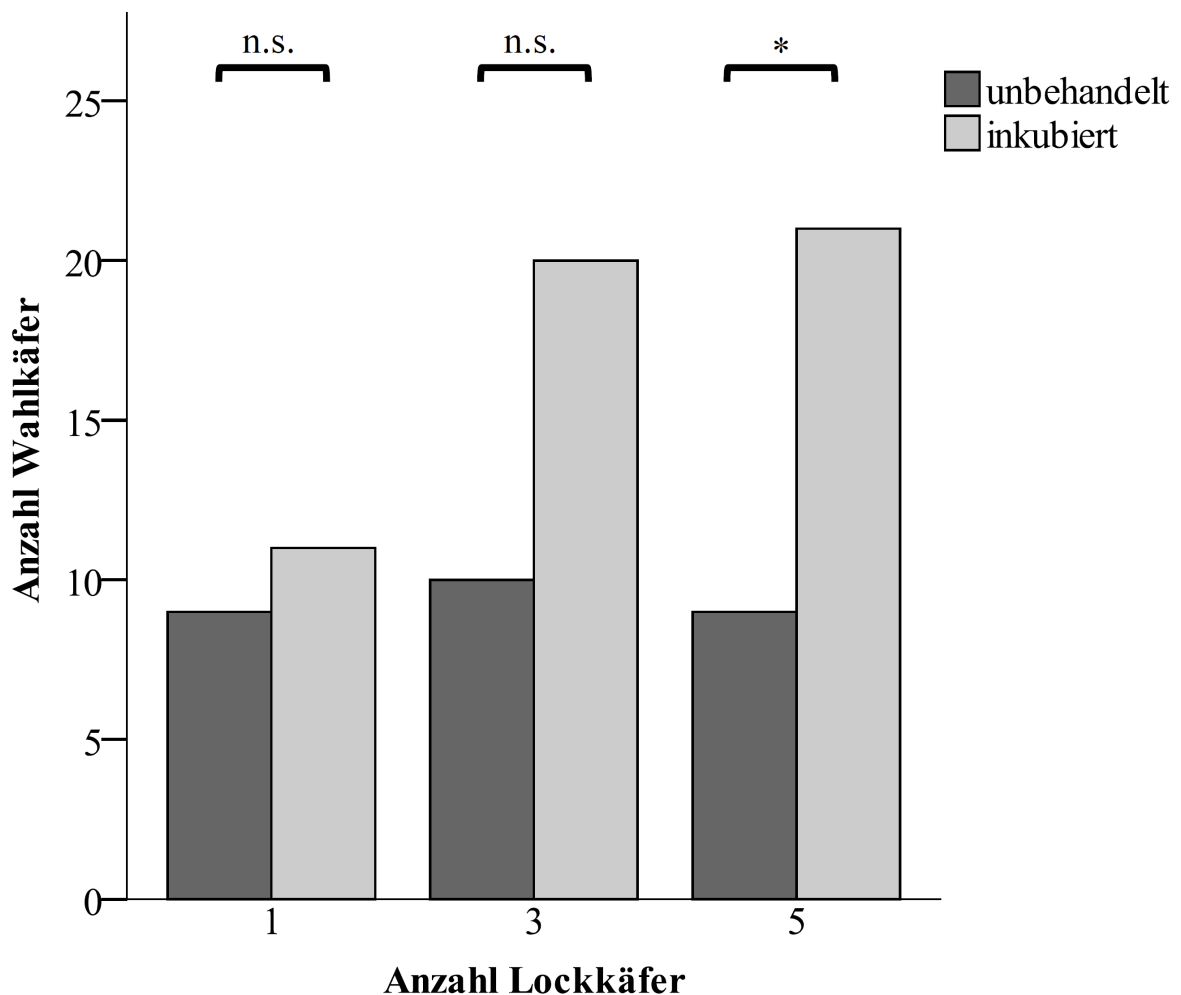


Abb. 46: Attraktivität von unbehandelten und inkubierten Lockkäferkollektiven, mit einer Größe von einem, drei und fünf Käfern, auf Wahlkäfer in einem Y-Rohr (Chi-Quadrat-Anpassungstest) (n.s.=nicht signifikant; * $p<0,05$).

Ergebnisse:

In dem zweiten Experiment konnten Lockkäfer in einem statischen Olfaktometer (Abb. 20) zwischen zwei Größen von Lockkäferkollektiven sowie einem leeren Behälter wählen. Eine anlockende Wirkung von inkubierten Käfern konnte ebenso mit dem statischen Olfaktometer nachgewiesen werden (Abb. 47). Inkubierte Käfer mit einer Kollektivgröße von drei und fünf lockten signifikant mehr Wahlkäfer an, als unbehandelte Käfer oder leere Becher (Friedman ANOVA, Dunn-Bonferroni post hoc Test: drei Lockkäfer: $\chi^2=27,37$, $p<0,001$, $n=30$; fünf Lockkäfer: $\chi^2=26,67$, $p<0,001$, $n=30$). Bei jeder Versuchswiederholung konnte jedoch festgestellt werden, dass der größere Anteil an Wahlkäfern sich nicht entschieden hat oder aufgrund von Rückenlage an aktiver Fortbewegung gehindert war. Diese wurden in der Analyse nicht berücksichtigt.

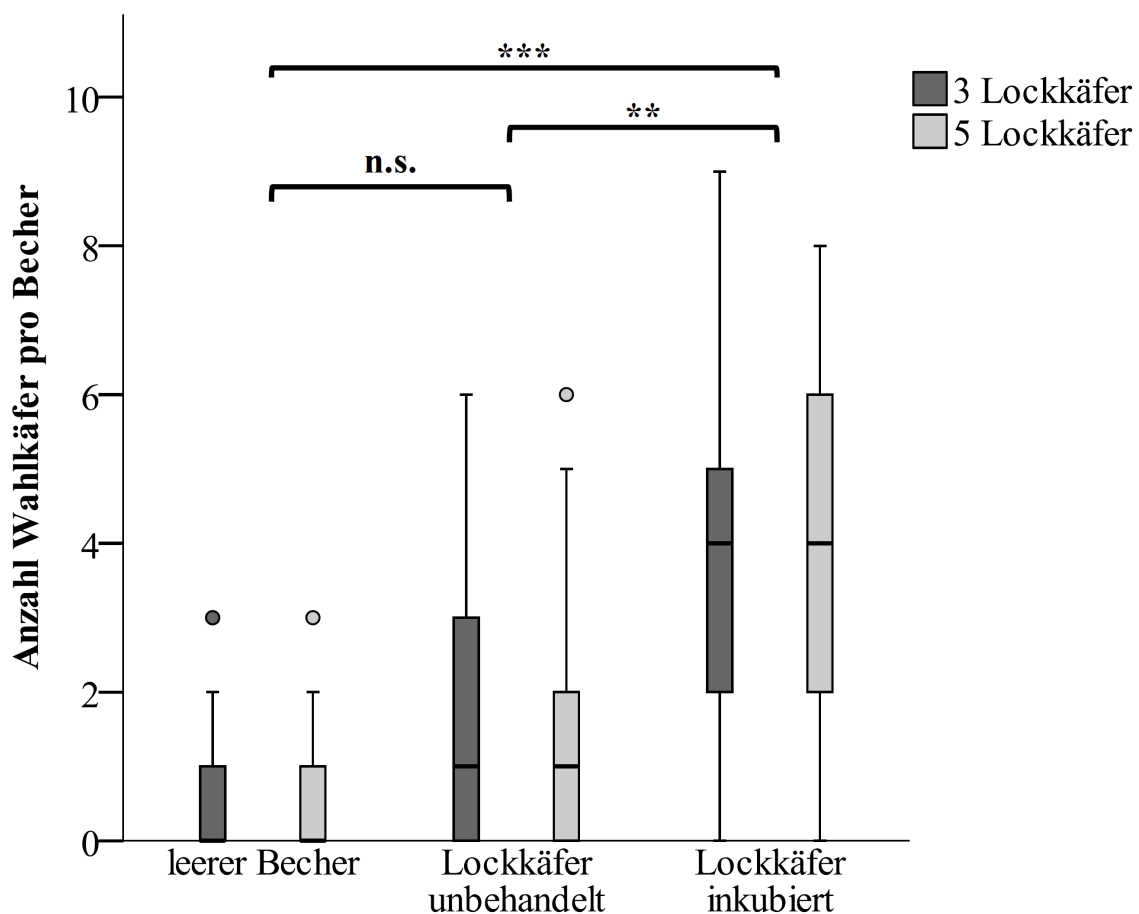


Abb. 47: Attraktivität von unbehandelten und inkubierten Käferkollektiven, mit je drei und fünf Käfern, und leeren Bechern auf Artgenossen in einem statischen Olfaktometer. Dargestellt sind Median, obere und untere Quartile, Spannweite und Ausreißer. Die Klammern verbinden verglichene Datenpaare (Friedman ANOVA, Dunn-Bonferroni post hoc Test) (n.s.=nicht signifikant; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$).

3.2.4 Einfluss der Käferdichte auf die tracheale Emission von VOCs

Im Rahmen der Untersuchung zur trachealen Emission von VOCs konnte neben einer Emission von cis-Verbenol auch eine Abgabe von (-)-Verbenon festgestellt werden. Bei

Ergebnisse:

hohen Käferdichten, wie sie während eines Massenangriffs auf einen Wirt vorkommen, wird eine vermehrte Abgabe des repellent wirkenden (-)-Verbenon erwartet. Als Käferdichteanzeiger würden bei einem Massenangriff neben olfaktorischen auch taktile und visuelle Signale möglich sein. Daher sollte in dieser Studie der Effekt der Käferdichte auf die VOC-Emission unter Laborbedingungen mit der Möglichkeit von olfaktorischen, taktilen und visuellen Interaktionen der Versuchstiere untersucht werden. Hierzu wurden Käfer in drei Kollektivgrößen (ein Käfer, drei Käfer und sechs Käfer) in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre inkubiert und anschließend die emittierten VOC-Mengen der drei Kollektive verglichen.

Bei dieser Untersuchung konnte herausgefunden werden, dass eine Erhöhung der Käferdichte den Wert des Verhältnisses des emittierten (-)-Verbenons zu cis-Verbenol erhöht (Anstieg der repellenten Wirkung) (Abb. 48, Kruskal-Wallis Test: $H=11,65$, $df=2$, $p=0,003$, $n=20$, Dunn-Bonferroni post hoc Test). Der höchste Wert des Verhältnisses wurde bei der Käferdichte mit sechs Käfern pro Inkubationsröhrchen erzielt. Dieser unterschied sich signifikant von den erzielten Werten der beiden anderen Käferkollektive.

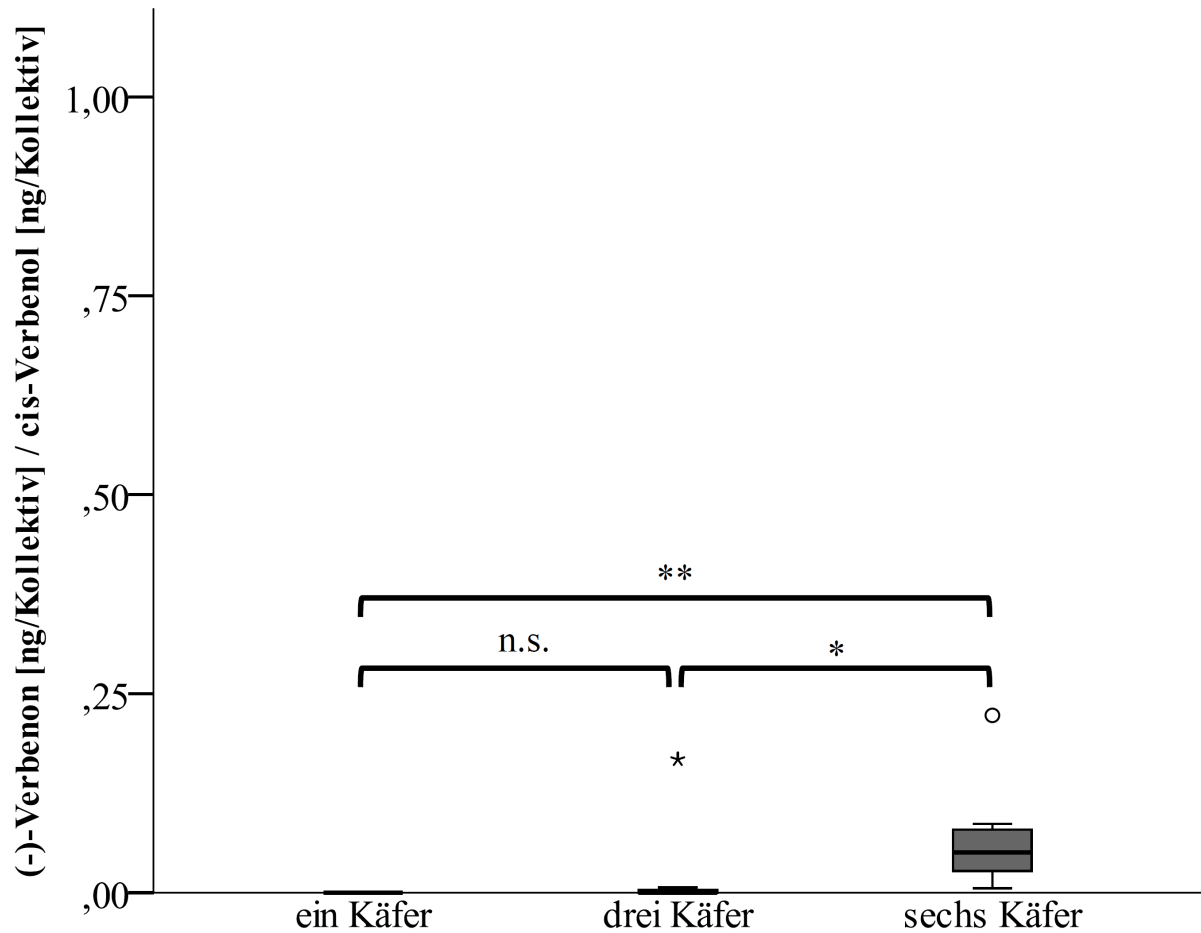


Abb. 48: Verhältnis exhalierter (-)-Verbenonmengen / cis-Verbenolmengen (in ng pro Käferkollektiv) nach Inkubation von Buchdruckern in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre bei drei Käferdichten. Zur Berechnung des Verhältnisses wurde die gesamte von den jeweiligen Käferkollektiven emittierte Menge an VOC berücksichtigt. Dargestellt sind Median, obere und untere Quartile, Spannweite und Ausreißer. Die Klammern verbinden verglichene Datenpaare (Kruskal-Wallis Test, Dunn-Bonferroni post hoc Test) (n.s.=nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

Zur Einzelbetrachtung der beiden Zielanalyten, wurde die mittlere emittierte VOC-Menge pro Käfer berücksichtigt. Hier konnte für cis-Verbenol keine signifikante Emissionserhöhung bei größerer Käferdichte beobachtet werden (Abb. 49, Kruskal-Wallis Test: $H=3,27$, $df=2$, $p=0,195$, $n=27$, Dunn-Bonferroni post hoc Test).

Ergebnisse:

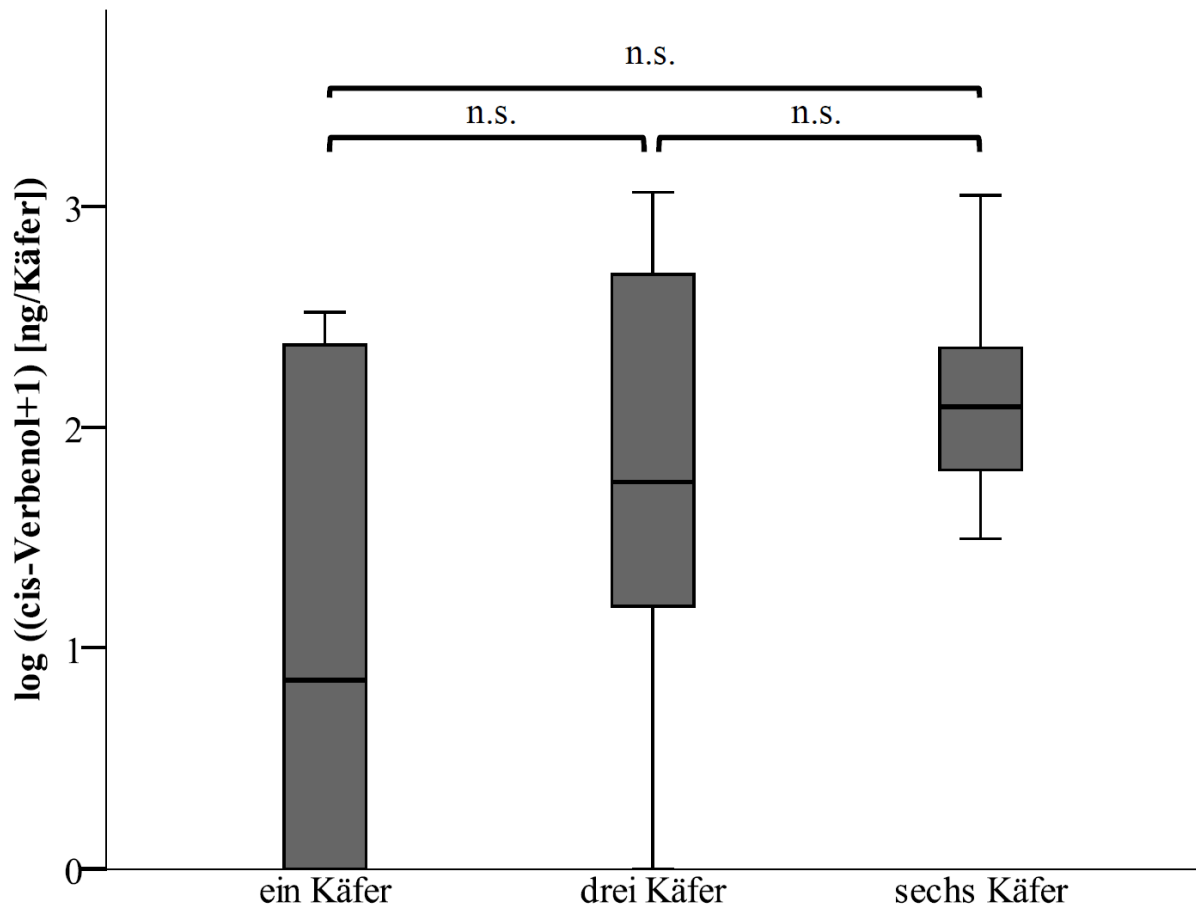


Abb. 49: Exhalierete cis-Verbenolmengen (in ng pro Käfer +1 durch log transformiert) nach Inkubation von Buchdruckern in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre bei drei Käferdichten. Dargestellt sind Median, obere und untere Quartile, Spannweite und Ausreißer. Die Klammern verbinden verglichene Datenpaare (Kruskal-Wallis Test, Dunn-Bonferroni post hoc Test) (n.s.=nicht signifikant)

Die exhalierete mittlere (-)-Verbenolmenge stieg bei einer Erhöhung der Käferdichte an (Abb. 50, Kruskal-Wallis Test: $H=18,26$, $df=2$, $p<0,001$, $n=27$, Dunn-Bonferroni post hoc Test). Bei einer Käferdichte von sechs Käfern exhalieren die Käfer signifikant mehr (-)-Verbenol als bei den Käferdichten mit drei oder einem Käfer.

Ergebnisse:

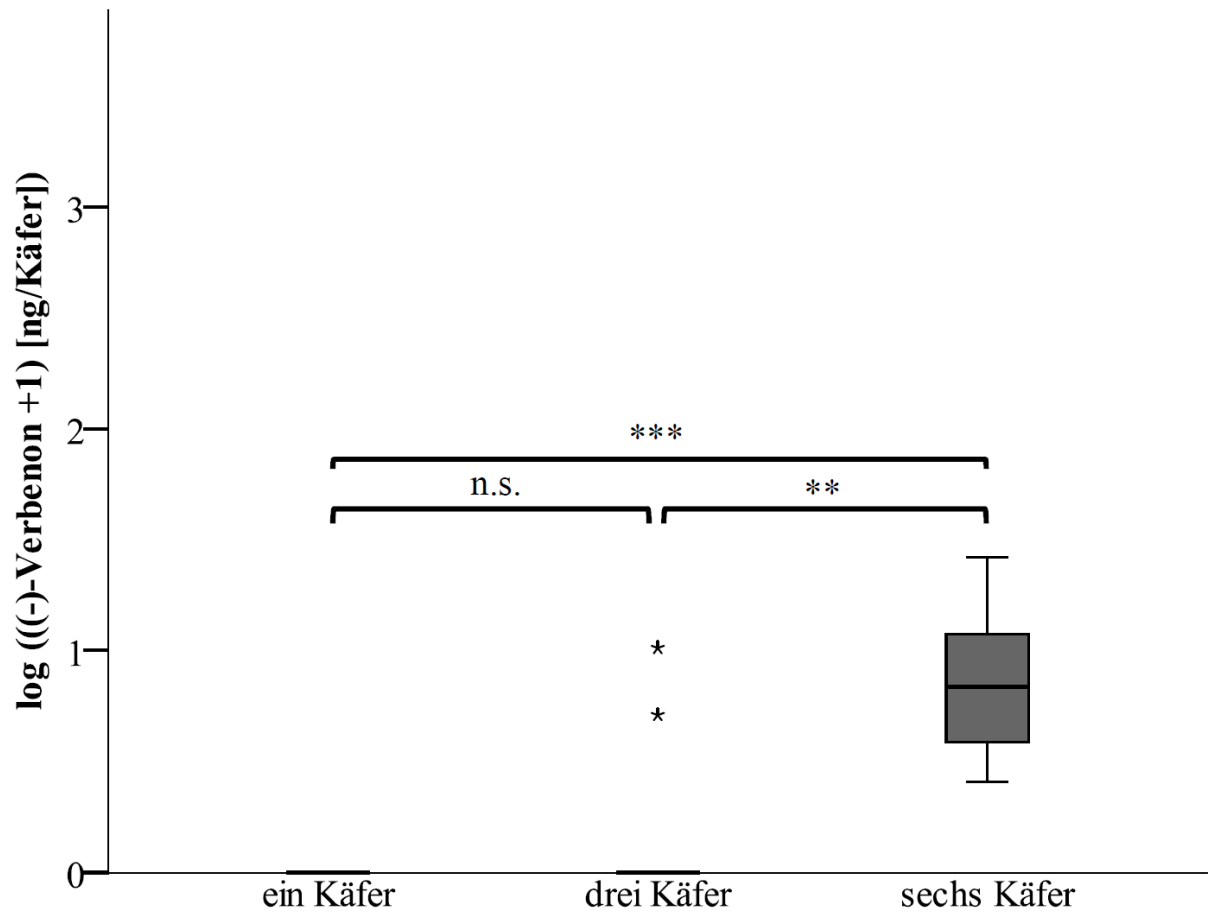


Abb. 50: Exhalierete (-)-Verbenonmengen (in ng pro Käfer +1 durch log transformiert) nach Inkubation von Buchdruckern in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre bei drei Käferdichten. Dargestellt sind Median, obere und untere Quartile, Spannweite und Ausreißer. Die Klammern verbinden verglichene Datenpaare (Kruskal-Wallis Test, Dunn-Bonferroni post hoc Test) (n.s.=nicht signifikant; ** $p<0,01$; * $p<0,001$)**

In Extrakten der anschließend an die Untersuchung der Exhalationsprodukte extrahierten Käfer, konnte kein Unterschied des Verhältnisses von (-)-Verbenons zu cis-Verbenol zwischen den drei Käferdichten gefunden werden (Abb. 51, Kruskal-Wallis Test: $H=4,03$, $df=2$, $p=0,133$, $n=22$, Dunn-Bonferroni post hoc Test).

Ergebnisse:

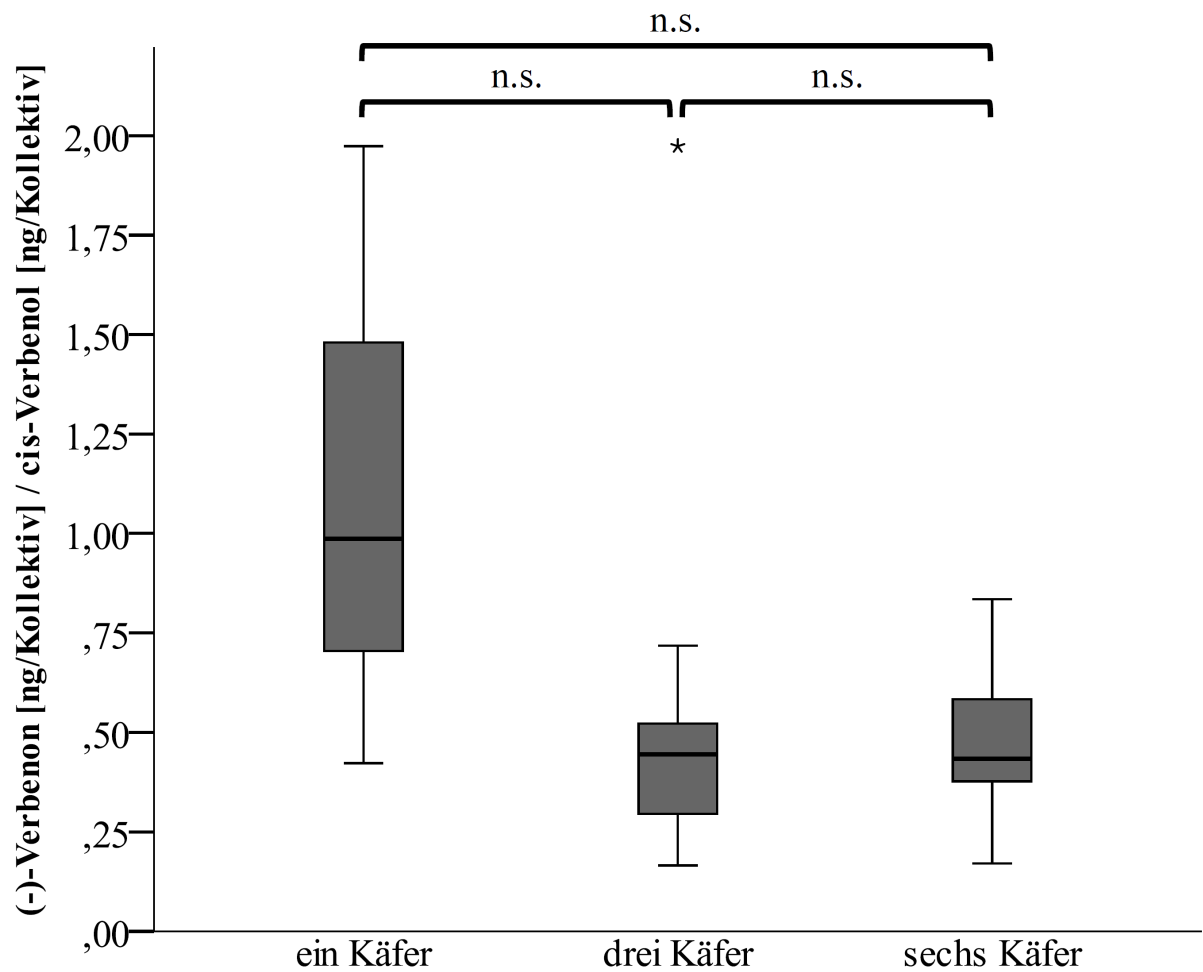


Abb. 51: Verhältnis von (-)-Verbenonmengen / cis-Verbenolmengen (in ng pro Käferkollektiv) in Käferextrakten nach Inkubation von Buchdruckern in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre bei drei Käferdichten. Zur Berechnung des Verhältnisses wurde die gesamte von den jeweiligen Käferkollektiven emittierte Menge an VOC berücksichtigt. Dargestellt sind Median, obere und untere Quartile, Spannweite und Ausreißer. Die Klammern verbinden verglichene Datenpaare (Kruskal-Wallis Test, Dunn-Bonferroni post hoc Test) (n.s.=nicht signifikant)

Auch die mittleren cis-Verbenolmengen in den Extrakten unterschieden sich zwischen den drei Käferdichten nicht (Abb. 52, Kruskal-Wallis Test: $H=4,7$, $df=2$, $p=0,095$, $n=30$, Dunn-Bonferroni post hoc Test).

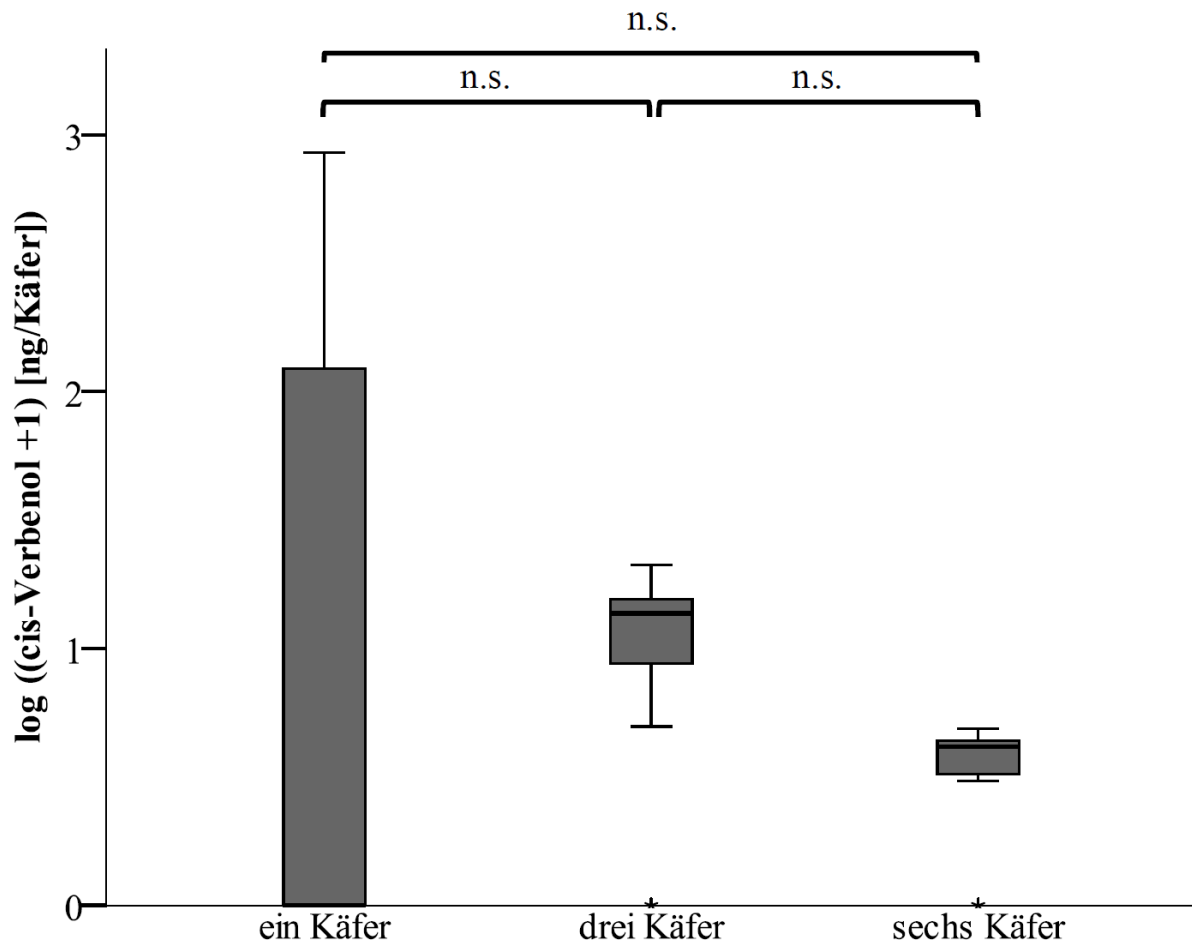


Abb. 52: Cis-Verbenolmengen (in ng pro Käfer +1 durch log transformiert) in Käferextrakten nach Inkubation von Buchdruckern in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre bei drei Käferdichten. Dargestellt sind Median, obere und untere Quartile, Spannweite und Ausreißer. Die Klammern verbinden verglichene Datenpaare (Kruskal-Wallis Test, Dunn-Bonferroni post hoc Test) (n.s.=nicht signifikant)

Jedoch die in den Extrakten gefundene Mengen an (-)-Verbenon nahm mit zunehmender Käferdichte ab (Abb. 53, Kruskal-Wallis Test: $H=18,99$, $df=2$, $p<0,001$, $n=30$, Dunn-Bonferroni post hoc Test). Hier gab es signifikante Mengenunterschiede zwischen den Käferdichten mit sechs Käfern und drei Käfern bzw. einem Käfer.

Ergebnisse:

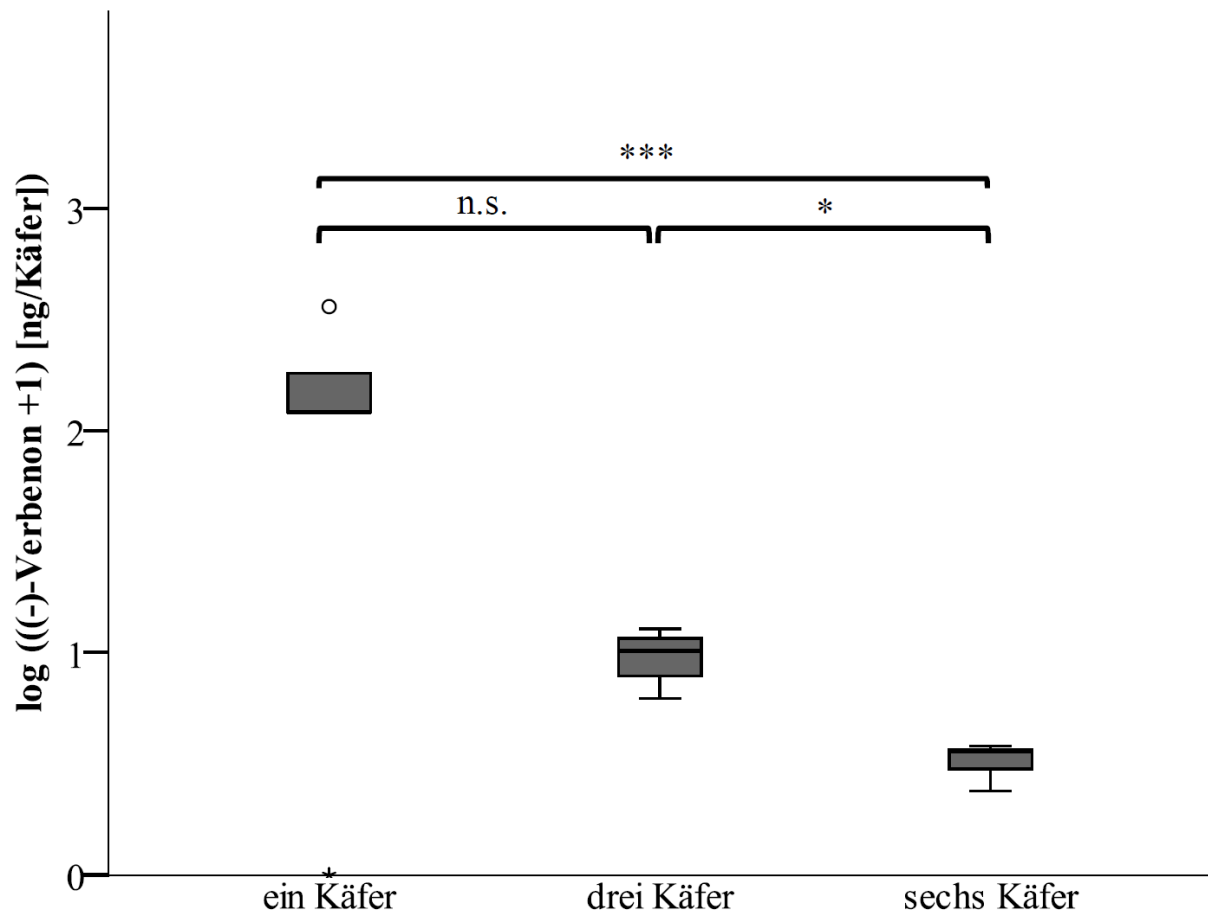


Abb. 53: (-)-Verbenonmengen (in ng pro Käfer +1 durch log transformiert) in Käferextrakten nach Inkubation von Buchdruckern in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre bei drei Käferdichten. Dargestellt sind Median, obere und untere Quartile, Spannweite und Ausreißer. Die Klammern verbinden verglichene Datenpaare (Kruskal-Wallis Test, Dunn-Bonferroni post hoc Test) (n.s.=nicht signifikant; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$)

3.3 Genetische Untersuchung zur Variabilität emittierter VOCs

Die in dieser Arbeit analysierten Mengen an cis-Verbenol wiesen eine große Spannweite auf und erreichten in der Untersuchung zur trachealen Kommunikation ein Maximum von 34613,45ng pro Käfer, bei einer Beprobungszeit von 15min in einem Closed-Loop System. Der Mittelwert lag hier bei 2775,13ng pro Käfer. Eine im Vergleich dazu geringere aber dennoch große Spannweite konnte bei (-)-Verbenon festgestellt werden. Hier lag der maximale Wert bei 3131,72 ng pro Käfer (Mittelwert: 69,51). Aufgrund dieser Beobachtungen sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die hohe Variabilität eine Entsprechung in der genetischen Populationsstruktur findet. Hierzu wurden 200 Käfer wie unter 2.5.1 beschrieben in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre inkubiert, anschließend extrahiert und die Mengen an cis-Verbenol und (-)-Verbenon bestimmt. Anschließend wurden die Käfer nach den in den Extrakten gefundenen Mengen an VOC in drei Klassen eingeteilt

Ergebnisse:

und per Isoenzymelektrophorese auf Unterschiede ihrer genotypischen Ausstattung überprüft. Ein besonderes Augenmerk lag hier auf Käfern welche besonders viel VOC produzierten.

In diesem Experiment konnte für cis-Verbenol pro Käfer ein maximaler Wert von 6881 ng bei einem Mittelwert von 1244,26ng gemessen werden. Bei (-)-Verbenon lag das Maximum bei 5618,23ng und der Mittelwert bei 1181,63ng. Somit wurde auch bei diesen Käfern eine große Spannweite gemessen.

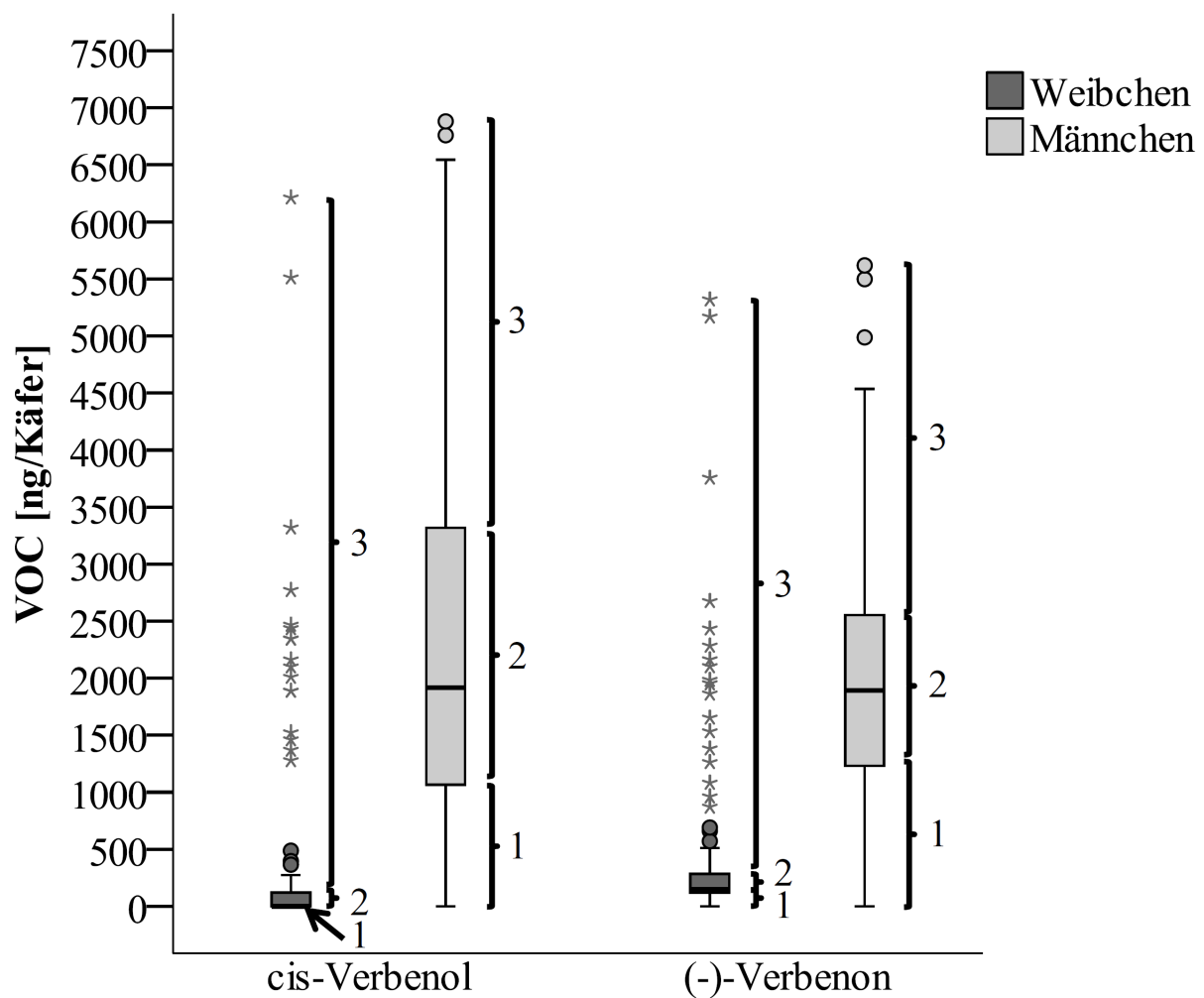


Abb. 54: Mengen an cis-Verbenol und (-)-Verbenon (in ng pro Käfer) in Extrakten inkubierter Käfer. Dargestellt sind Median, obere und untere Quartile, Spannweite und Ausreißer. Die Klammern markieren die Klassen, nach denen die Käfer bezüglich ihrer Menge an produzierten VOCs eingeteilt wurden (Klasse 1: geringe VOC-Produktion, Klasse 2: mittlere VOC-Produktion und Klasse 3: hohe VOC-Produktion).

Die elektrophoretische Untersuchung der Käfer ergab, dass sich die drei Klassen (Klasse 1: geringe VOC-Produktion, Klasse 2: mittlere VOC-Produktion und Klasse 3: hohe VOC-Produktion) anhand ihrer genotypischen Ausstattung unterscheiden lassen. Signifikante Unterschiede wurden zwischen wenig und mittel cis-Verbenol produzierenden weiblichen

Ergebnisse:

Käfern gefunden (Tab. 12). Bei der Klassifizierung nach der produzierten (-)-Verbenonmenge unterschieden sich Weibchen und Männchen der viel-produzierenden Klasse (Tab. 13). Eine klare Unterscheidung der Klasse 3 von den beiden anderen Klassen konnte sowohl bei der Klassifizierung nach der cis-Verbenolmenge als auch bei der Klassifizierung nach der (-)-Verbenonmenge nicht gefunden werden.

Tab. 12: Darstellung der Unterschiede der genotypischen Ausstattung im Vergleich zwischen wenig (Klasse 1), mittel (Klasse 2) und viel (Klasse 3) cis-Verbenol produzierenden Käfern (Exakter G-Test, n=200).

Klassifizierung nach cis-Verbenolmenge				
Klassifizierung/Geschlecht	Klassifizierung/Geschlecht	chi²	df	p
1/w	2/w	33,379	16	0,007
1/w	3/w	13,318	16	0,649
2/w	3/w	4,822	12	0,964
1/m	2/m	2,167	12	0,999
1/m	3/m	6,874	14	0,939
2/m	3/m	12,312	14	0,581
1/w	1/m	5,151	12	0,953
2/w	2/m	10,467	12	0,575
3/w	3/m	6,615	14	0,949

Tab. 13: Darstellung der Unterschiede der genotypischen Ausstattung im Vergleich zwischen wenig (Klasse 1), mittel (Klasse 2) und viel (Klasse 3) (-)-Verbenon produzierenden Käfern (Exakter G-Test, n=200).

Klassifizierung nach (-)-Verbenon				
Klassifizierung/Geschlecht	Klassifizierung/Geschlecht	chi²	df	p
1/w	2/w	21,767	18	0,243
1/w	3/w	20,960	14	0,103
2/w	3/w	16,807	16	0,398
1/m	2/m	3,012	14	0,999
1/m	3/m	5,027	10	0,889
2/m	3/m	21,669	14	0,086
1/w	1/m	4,818	12	0,964
2/w	2/m	18,094	18	0,449
3/w	3/m	19,469	10	0,035

4 Diskussion:

4.1 VOC-Emission an befallenen Fichten

Die auf Buchdrucker wirkende Attraktivität von durch Artgenossen befallenen Fichten wird durch die Emission attraktiver oder repeller VOCs gesteuert. Wie in der Arbeit von Birgersson und Bergström (1989) bereits festgestellt wurde, unterliegt die Emission von attraktiven bzw. repellenten Kommunikationsstoffen einer zeitlichen Dynamik. Die beiden Autoren untersuchten die Emission von VOCs an individuellen Bohrlöchern während der ersten Befallswoche. Hierbei konnten sie eine erhöhte Emission des attraktiv wirkenden cis-Verbenols während der ersten beiden Tage eines Befalls feststellen, sowie ein Anstieg der Emission des repellent wirkenden (-)-Verbenons gegen Ende der ersten Befallswoche. Diese Beobachtung zeigt, dass die Attraktivität befallener Fichten während der initialen Phase eines Befalls variiert. Wie sich die Attraktivität befallener Fichten, gemessen an emittierten VOCs, über die erste Befallswoche hinaus verhält, ist noch nicht geklärt. Es gibt noch keine Studien, die die Emission während eines kompletten Befallsverlaufs im Freiland untersucht haben. Jedoch sollten auch nach der ersten Befallswoche VOCs emittiert werden und damit die Attraktivität der Bäume beeinflussen. Das für die Käfer ab bestimmten Konzentrationen giftige Harzterpen (-)- α -Pinen (Bohlander 1996) wird von den Parentalkäfern während der Anlage der Brutsysteme, von Larven während des Larvenfraßes und von den Filiarkäfern während des Reifungsfraßes aufgenommen. Mit Ausnahme des Zeitraumes, in dem sich die Brut im Puppenstadium befindet, findet somit eine fraßbedingte Aufnahme von (-)- α -Pinen während des gesamten Befallsverlaufs statt. Die Aufnahme von (-)- α -Pinen führt zu dessen Oxidation, die durch Enzyme aus der Cytochrom P450 Familie katalysiert wird (Renwick *et al.* 1976; White *et al.* 1979; Klimetzek und Francke 1980; White *et al.* 1980; Blomquist *et al.* 2010). Das Oxidationsprodukt ist cis-Verbenol. Aufgrund der Synthese von cis-Verbenol, die unter anderem stark durch die vorhandene (-)- α -Pinenkonzentration im Wirtsbaum beeinflusst wird (Byers 1981; Birgersson *et al.* 1988; Birgersson 1989), sollte auch eine Freisetzung stattfinden. Auch das Oxidationsprodukt von cis-Verbenol, das repellent wirkende (-)-Verbenon (Blomquist *et al.* 2010), müsste emittiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher zunächst die Hypothese überprüft, dass cis-Verbenol und (-)-Verbenon auch nach der initialen Phase eines Befalls emittiert werden. Außerdem interessierte die zeitliche Variabilität der Emission. Da (-)- α -Pinen die Vorstufe von cis-Verbenol ist und es zumindest in Kombination mit (+)-Limonen einen attraktiven Effekt

auf das Anflugverhalten von Buchdruckern hat (Führer *et al.* 1991; Reddemann und Schopf 1996), wurde auch dessen Emissionsverlauf untersucht.

Zur Untersuchung der Emission der drei Zielanalyten wurden an befallenen liegenden Fichten im Freiland (siehe 2.4.1 und 2.4.2) und von befallenen Rindenstücken im Labor (siehe 2.4.3) emittierte VOCs gesammelt und per TD-GC-MS (siehe 2.7.1) analysiert. Weiterhin wurden folgende Faktoren als emissionsbeeinflussend eingeschätzt und zur Analyse der Hintergründe für die zeitliche Emissionsvariation verwendet: Neben dem Faktor der voranschreitenden Zeit, der hauptsächlich durch die Alterung der Wirtsbäume und durch den Entwicklungsfortschritt der Brut beeinflusst und im folgenden als „Tage nach Befall“ bezeichnet wird, wurden Tagesgang, Befallsdichte, Kambialtemperatur und das Vorhandensein von Vorstufen berücksichtigt.

In allen drei Experimenten konnten die drei Zielanalyten in dem emittierten Duftbouquet während des gesamten Befallsverlaufs nachgewiesen werden. Außerdem zeigte jeder Analyt ein spezifisches Emissionsmuster (siehe Abb. 25, Abb. 26, Abb. 32, Abb. 33 und Abb. 36), welches sich durch brutsysteminterne Vorgänge, wie zum Beispiel der Entwicklungsfortschritt der Brut, aber auch durch äußerliche Faktoren, wie Temperatur und der Zeitpunkt der Brutanlage im Jahr, erklären lassen.

4.1.1 (-)- α -Pinen-Emission

An befallenen liegenden Fichten konnte zunächst ein Anstieg der (-)- α -Pinen-Emission beobachtet werden, der von einem plötzlichen Emissionseinbruch gefolgt wurde (siehe Abb. 25 und Abb. 26 sowie Abb. 32 und Abb. 33). Die Gegenüberstellung der an den jeweiligen Messtagen erreichten Käferstadien der Brut unter der Rinde und der beobachteten (-)- α -Pinen-Emission führte zu der Vermutung, dass der mit der Entwicklung der Brut verknüpfte Fraß maßgeblich für das beschriebene Emissionsmuster verantwortlich ist. Die zu Beginn zunehmende (-)- α -Pinen-Emission spiegelt den Fraß der Larven während der Entwicklung wieder. Der hierbei zunehmende Grad an Bastverletzungen führt zu einem erhöhte Harzfluss, was eine Steigerung der Freisetzung des Harzterpens (-)- α -Pinen zur Folge hat. Der fraßbedingte Aufschluss von Harzkanälen sowie die Anhäufung von Bohrmehl führen zu Oberflächenvergrößerungen, die die Verflüchtigung und die Emission von (-)- α -Pinen durch Öffnungen in der Borke wie zum Beispiel an Bohrlöcher und Lentizellen (Rosner und Kartusch 2003) verstärken. Auf das Larvenstadium folgt mit dem Puppenstadium anschließend eine Phase ohne Fraß im Bast. Da in dieser Phase dem Bast keine weiteren Verletzungen zugeführt werden, kommt es zu einem steilen Abfall der Emission von

(-)- α -Pinen. Erst im Jungkäferstadium wird erneut ein Fraß im Bast durchgeführt. Aufgrund neu auftretender Bastverletzungen könnte hier nun ein erneuter Anstieg der Emission von (-)- α -Pinen vermutet werden, welcher in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht beobachtet wurde (siehe Abb. 25 und Abb. 26 sowie Abb. 32 und Abb. 33). Dies lässt sich mit dem zum Versuchsende vorherrschenden hohen Grad an Bastverletzungen (Fraßgänge von Käfern und Larven sowie die Schnittfläche der Versuchsbäume) erklären, die an den betroffenen Flächen zur Verflüchtigung des (-)- α -Pinsens führten. Das zeitliche Muster der (-)- α -Pinen-Emission im Laborversuch unterschied sich von den Mustern der Freilandversuche (siehe Abb. 36). Hier wurde während des Larvenstadiums der Brut kein Anstieg der Emission von (-)- α -Pinen festgestellt. Auch der in den Freilandversuchen festgestellte Einbruch der Emission konnte im Laborversuch nicht reproduziert werden. Als Ursache für das unterschiedliche (-)- α -Pinen-Emissionsmuster wird hier die Verwendung von Rindensandwiches vermutet. Die in den Sandwiches verwendeten Rindenstücke wiesen durch den Schnitt bedingt große Verletzungen auf, die zu einer Verflüchtigung des (-)- α -Pinsens geführt haben. Dies bestätigt der Vergleich der gemessenen (-)- α -Pinen-Konzentrationen in dem zweiten Freilandversuch (siehe Abb. 32 und Abb. 33) und dem Laborversuch. Die Konzentrationen waren im Labor am geringsten (siehe Abb. 36). Aufgrund des durchgängig niedrigen Harzgehaltes in den Rindenstücken, wurde keine durch Fraßverletzungen verursachte erhöhte Emission bzw. ein Einbruch der Emission von (-)- α -Pinen festgestellt.

Bei der Analyse der emissionsbeeinflussenden Faktoren stellte sich heraus, dass der Faktor „Tage nach Befall“ einen Effekt auf die (-)- α -Pinen-Emission hat. Mit voranschreitender Zeit nahm die Emission von (-)- α -Pinen signifikant ab. Dieses Ergebnis bestätigt den oben beschriebenen Emissionsverlauf von (-)- α -Pinen, der durch den Fraß der Brut und der hiermit beschleunigten Alterung der Versuchsbäume maßgeblich beeinflusst wurde. Der Vergleich der (-)- α -Pinen-Emission am Vormittag und der am Nachmittag ergab keinen signifikanten Unterschied (siehe Abb. 24). Die Lufttemperaturen, die in der Literatur im Tagesgang als emissionsbeeinflussend beschrieben werden (Janson 1993), unterschieden sich bei den Messungen am Vormittag und Nachmittag nur gering (siehe Tab. 3), so dass dieser mangelnde Temperaturunterschied als Ursache für den hier fehlenden Effekt des Tagesganges auf die Emission von (-)- α -Pinen angenommen wird. Auch die gemessenen Kameraltemperaturen zeigten keine versuchsübergreifende interpretierbare Beeinflussung der Emission von (-)- α -Pinen. Es konnte beobachtet werden, dass höhere Temperaturen einerseits einen emissionssteigernden (siehe Tab. 4) und andererseits einen emissionsreduzierenden Effekt (siehe Tab. 6) haben. Dieses widersprüchliche Ergebnis führt zu der Hypothese, dass

der Emissionsverlauf von (-)- α -Pinen hauptsächlich durch den Fraß der Brut moduliert und der Effekt der Kambialtemperatur dadurch überlagert wird. Trotz des vermuteten starken Zusammenhanges des (-)- α -Pingenhalts im Bast mit der Emission von (-)- α -Pinen konnte in dieser Studie kein Zusammenhang festgestellt werden. Die gemessenen (-)- α -Pinenkonzentrationen aus Baststanzen, die bei jeder Messung aus unbefallenen Regionen der Versuchsbäume des Freilandversuches aus dem Jahre 2010 (siehe 2.4.2) genommen wurden, zeigten keinen Effekt auf die Emission von (-)- α -Pinen. Obwohl die Emission von (-)- α -Pinen mit der Zeit zurück ging, blieben die Konzentrationen in den Baststanzen über den Versuchszeitraum gleich (siehe Abb. 35). Fehlende Vernetzungen der Harzkanäle zwischen befallenen und unbefallenen Regionen der Bäume können hier als Ursache angesehen werden. Die Harzkanäle von Fichten sind nicht flächendeckend miteinander verbunden und unter Umständen entstehen sie erst bei Verletzungen (Baier 1996; Nagy *et al.* 2000; Franceschi 2005). Diese Kenntnisse lassen vermuten, dass hier Messungen an nicht vernetzten Regionen durchgeführt wurden und so auch keine Beeinflussung nachweisbar war. Die Emission von (-)- α -Pinen scheint somit hauptsächlich durch den Fraß der Brut bedingt zu sein.

4.1.2 Cis-Verbenol-Emission

Das Emissionsmuster von cis-Verbenol unterschied sich im zeitlichen Verlauf nicht nur von den Mustern der beiden anderen Zielanalyten, sondern auch zwischen den durchgeführten Versuchen.

Bei dem Versuch, der zum Zeitpunkt der Anlage der F1-Generation durchgeführt wurde (siehe 2.4.2), konnte eine erhöhte cis-Verbenol-Emission zu Beginn der Untersuchung festgestellt werden, die im weiteren Verlauf erst abnahm, dann jedoch erneut anstieg und zum Teil sogar das zu Beginn gemessene Emissionsniveau überschritt (siehe Abb. 32 und Abb. 33). Dieses Emissionsmuster glich dem beobachteten Muster aus der Untersuchung im Labor (siehe Abb. 36). Es unterschied sich jedoch von dem Muster, das während der Anlage der F2-Generation beobachtet wurde. Hier nahm die anfangs erhöhte Emission von cis-Verbenol mit voranschreitender Zeit im Mittel ab (siehe Abb. 25 und Abb. 26).

Die zu Beginn der Untersuchungen beobachtete erhöhte Emission von cis-Verbenol steht im engen Zusammenhang mit der Paarungspartnerfindung am Anfang eines Befalls. Dies zeigt die Beobachtung von Birgersson und Kollegen in ihrer Studie aus dem Jahr 1984, bei der Darmextrakte von Käfern aus verschiedenen Befallsphasen analysiert wurden. Bei unverpaarten Männchen konnten hier höhere Konzentrationen von cis-Verbenol als bei

Diskussion:

verpaarten nachgewiesen werden. Für den jeweiligen in den beiden Freilandversuchen beschriebenen Rückgang der cis-Verbenol-Emission kann demnach davon ausgegangen werden, dass zu diesem Zeitpunkt eine erfolgreiche Verpaarung erfolgt war. Die Berechnung der Entwicklungsstadien mittels der Gradtagmethode bestätigt diese Hypothese, da zum Zeitpunkt der Messung sogar bereits die Eiablage durch die Weibchen stattgefunden hat (siehe Abb. 25 und Abb. 26 sowie Abb. 32 und Abb. 33). Da nun der Fraß und damit die Aufnahme von (-)- α -Pinen durch die Parentalkäfer reduziert war, wurde weniger (-)- α -Pinen zu cis-Verbenol umgesetzt, was dessen Emission reduzierte.

Weiterhin kann vermutet werden, dass die Photoperiode einen Einfluss auf die Emission von cis-Verbenol hat. Eine photoperiodische Beeinflussung könnte die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Emissionsmusterunterschiede erklären. Denn es wird davon ausgegangen, dass die Photoperiode eine maßgebliche Rolle bei der Induktion der Diapause der Käfer spielt (Schopf 1985; Schopf 1989; Dolezal und Sehnal 2007) sowie einen Einfluss auf das neuroendokrine System hat (Pener 1992). Eine Beeinflussung der Juvenilhormonbildung könnte nun für die Regulierung der Produktion und Emission von cis-Verbenol verantwortlich sein. Juvenilhormon wird in der Literatur als möglicher Regulator der Pheromonproduktion angegeben (Hughes und Renwick 1977; Tittiger *et al.* 1999; Bearfield *et al.* 2009; Blomquist *et al.* 2010). In der Arbeit von Hughes und Renwick (1977) wird Juvenilhormon III als produktionssteigernd für cis-Verbenol erwähnt. Für Individuen, die photoperiodisch auf Diapause eingestellt werden, würde dies bedeuten, dass die Produktionsaktivität von cis-Verbenol heruntergefahren wird, was sich in der Emission an befallenen Bäumen widerspiegeln müsste. Wie oben bereits beschrieben konnte in der vorliegenden Arbeit solch ein Rückgang der cis-Verbenol-Emission an Fichten beobachtet werden, in denen sich F2-Brut entwickelte (siehe Abb. 25 und Abb. 26). Außerdem sollten Individuen, die nicht auf Diapause „programmiert“ sind, eine erhöhte Produktivität von cis-Verbenol aufweisen. An Fichten, in denen sich Individuen aus der F1-Generation entwickelten, konnte die soeben beschriebene erhöhte cis-Verbenol-Produktion anhand der Emission gezeigt werden (siehe Abb. 32 und Abb. 33).

Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass die emittierte Menge an cis-Verbenol von der Anzahl an emittierenden Individuen abhängig ist. Dies zeigt der Vergleich der festgestellten cis-Verbenol-Konzentrationen der beiden hier gewählten Befalldichten. Bei höherer Dichte war auch die cis-Verbenol-Emission erhöht (siehe Abb. 32 und Abb. 33). So kann die die Anzahl der Parentalkäfer übersteigende Anzahl an Nachkommen für die

Diskussion:

beobachtete Überschreitung der anfangs beobachteten cis-Verbenol-Emission verantwortlich sein.

Zusätzlich zu dem bereits beschriebenen Rückgang der cis-Verbenol-Emission zu Beginn der Untersuchungszeit waren in dem zweiten Freilandversuch zwei weitere Emissionseinbrüche auffällig (siehe Abb. 33 am 08.7.2010 und 28.07.2010). Ursächlich für den am 08.07.2010 beobachteten Emissionseinbruch war der Übergang der Brut vom Larvenstadium zum Puppenstadium. Der fehlende Fraß verpuppter Individuen führte zu einer reduzierten Emission von cis-Verbenol. Der Einbruch am 28.07.2010 war vermutlich durch die Temperatur bedingt. Die mittlere Luft- bzw. Kambialtemperatur betrug an diesem Tag weniger als 15°C. Bei Temperaturen unter 15°C findet nach Wermelinger und Seifert (1998) beim Buchdrucker kein Reifungsfraß statt und somit wird weniger (-)- α -Pinen aufgenommen. Dies führte zu einer geringeren Produktion bzw. Emission von cis-Verbenol.

Bei der Analyse der emissionsbeeinflussenden Faktoren konnten zwei Effekte des Faktors „Tage nach Befall“ beobachtet werden. Zum einen stieg die cis-Verbenol-Emission bei voranschreitender Zeit an (siehe Tab. 6) und zum anderen nahm sie ab (siehe Tab. 4). Diese Ergebnisse bestätigen die oben beschriebenen Emissionsverläufe, bei denen eine photoperiodische Steuerung vermutet wird. Als weiterer Faktor wurde der Einfluss der Kambialtemperatur auf die cis-Verbenol-Emission überprüft. Hierbei wurde kein genereller Effekt nachgewiesen. Es wird davon ausgegangen, dass die Kambialtemperatur nur dann einen Einfluss auf die cis-Verbenolemission hat, wenn sie die physiologische Aktivität der Käfer beeinträchtigt. Dies scheint während der beiden Freilandversuche nur punktuell eingetreten zu sein. Zum Beispiel wurde, wie oben erwähnt, in dem zweiten Freilandversuch bei einer Temperatur von unter 15°C eine geringere cis-Verbenol-Emission festgestellt (siehe Abb. 33) und dies mit einem reduzierten Reifungsfraß (Wermelinger und Seifert 1998) begründet. Wie bereits bei der Überprüfung des Einflusses des (-)- α -Pinengehalts im Bast auf die Emission von (-)- α -Pinen kein Effekt nachgewiesen werden konnte, gab es auch keine Beeinflussung der cis-Verbenol-Emission durch den (-)- α -Pinengehalt. Auch hier wird angenommen, dass die gefundenen (-)- α -Pinenkonzentrationen in den Baststanzen (welche sich während der Untersuchung nicht signifikant veränderten, siehe Abb. 35) nicht den Konzentrationen entsprachen, die den Käfern beim Fraß als Vorstufe von cis-Verbenol vorlagen. Dies kann wie bereits oben beschrieben durch fehlende Vernetzung der Harzkanäle (Baier 1996; Nagy *et al.* 2000; Franceschi 2005) sowie durch Terpenmustervariationen entlang der Versuchsbäume (Führer *et al.* 1991) bedingt worden sein.

4.1.3 (-)-Verbenon-Emission

In der Literatur wird (-)-Verbenon als Pheromonkomponente beschrieben, die mit ihrer repellenenten Wirkung einen regulierenden Effekt auf die Befallsdichte am Wirt hat (Bakke 1981; Schlyter *et al.* 1989; Byers 1993). Hierbei ist weder vollständig verstanden, welche Faktoren die Emission von (-)-Verbenon steuern, noch ist der genaue Wirkungsradius bekannt (Schlyter *et al.* 1989):

Als möglicher Faktor, der die Emission von (-)-Verbenon beeinflussen könnte, sollte in der vorliegenden Arbeit zunächst der Effekt der bereits vorhandenen Käferdichte an einem Wirt überprüft werden. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass eine Steigerung der Käferdichte an einem Wirt zu einer Erhöhung der (-)-Verbenon-Emission führt. Dieses konnte jedoch in den oben beschriebenen Freilandversuchen nicht gezeigt werden. Eine größere Käferdichte führte hier zu keinem Anstieg der (-)-Verbenon-Emission (siehe Tab. 4 und Tab. 6). Dies kann daran gelegen haben, dass die zu den jeweiligen Messungen vorherrschenden Befallsdichten nicht groß genug waren und sie so zu keiner konkurrenzbedingten Erhöhung der Emission von (-)-Verbenon führten.

Um weitere Effekte zu überprüfen, die Aufschluss über die Emission von (-)-Verbenon geben, wurde mittels linearer Regressionsanalyse überprüft, ob die Faktoren „Tage nach Befall“, Kambialtemperatur sowie die (-)- α -Pinenkonzentration im Bast einen Einfluss haben. Auch hier zeichnete sich keine sich in den drei Versuchen wiederholende Abhängigkeit ab, was einen Effekt der genannten Faktoren in Frage stellt.

Weiterhin wird in der Literatur eine mögliche Produktion von (-)-Verbenon durch Autoxidation bzw. durch Mikroorganismen in dem die Käfer umgebenden Bast aus cis-Verbenol beschrieben (Leufven *et al.* 1984; Hunt *et al.* 1989; Hunt und Borden 1990). Die bloße Existenz von (-)-Verbenon bzw. der Verlauf der Emission muss somit nicht unbedingt einen ökologischen Hintergrund haben, wie zum Beispiel Konkurrenzdruck, sondern kann dadurch begründet sein, dass eine Metabolisierung von cis-Verbenol stattgefunden hat. Demnach könnte es einen Zusammenhang zwischen der cis-Verbenol-Emission und der (-)-Verbenon-Emission geben. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser mögliche Zusammenhang der beiden antagonistisch wirkenden Analyten pro Messtag und über den gesamten Untersuchungszeitraum überprüft (siehe Tab. 5, Tab. 7 und Tab. 9). Die Analysen pro Messtag lassen kein sich in den drei Versuchen wiederholendes Muster erkennen. Nur über den gesamten Zeitraum gesehen scheint es eine Abhängigkeit der (-)-Verbenon-Emission von der cis-Verbenol-Emission zu geben, was die Tatsache bestätigt, dass cis-Verbenol die Vorstufe von (-)-Verbenon ist.

Die in dieser Arbeit nicht kongruent nachweisbaren Effekte von Befallsdichte, „Tage nach Befall“, Kambialtemperatur und (-)- α -Pinenkonzentration im Bast sowie des nicht versuchsübergreifend gefundenen Zusammenhanges der cis-Verbenol und (-)-Verbenon-Emission, könnte als Hinweis gedeutet werden, dass es einen weiteren, vielleicht sogar käferinternen Steuerungsmechanismus zur Emission von (-)-Verbenon gibt, der die möglichen Effekte der getesteten Faktoren überlagert.

Zum Wirkungsradius von (-)-Verbenon wird vermutet, dass er generell eher kleinräumig ist. Niemeyer und Kollegen (1995) beobachteten einen Wirkungsbereich von 2m, in der Arbeit von Jakus *et al.* (2003) wird ein Wirkungsradius von nur 1m erwähnt. Die im Vergleich zu cis-Verbenol (Siedepunkt: 88°C) und (-)- α -Pinen (Siedepunkt: 155°C) geringe Flüchtigkeit von (-)-Verbenon (Siedepunkt: 227°C) unterstreicht zudem die Vermutung des eher kleinräumigen Wirkungsbereiches von (-)-Verbenon. Die geringe Flüchtigkeit von (-)-Verbenon führt zu einer geringeren Emission und damit zu einem nur kleinen Ausbreitungsbereich bzw. Wirkungsbereich. In der vorliegenden Arbeit konnte in allen drei Versuchen nur eine geringe Emission von (-)-Verbenon festgestellt werden (siehe Abb. 25 und Abb. 26 sowie Abb. 32, Abb. 33 und Abb. 36).

(-)-Verbenon könnte somit für die Steuerung der optimalen Befallsdichte direkt am Wirt verantwortlich sein.

4.1.4 Schlussfolgerung zur VOC-Emission an befallenen Fichten

Wie sich in den Versuchen zur VOC-Emission an befallenen Fichten herausstellte, scheint die Emission von (-)- α -Pinen maßgeblich durch den Fraß der Brut und der damit verbundenen Freisetzung von (-)- α -Pinen an geschädigtem Bastgewebe moduliert zu werden.

In der Arbeit von Vanderwel (1994) werden zwei grundlegende Faktoren erwähnt, die die Produktion bzw. Emission von Pheromonen bei Käfern beeinflussen: Einerseits die Verfügbarkeit von Vorstufe und andererseits eine hormonelle Steuerung der beiden Prozesse. Erstere trifft auf die Emission von cis-Verbenol durch den Buchdrucker ebenso zu (Renwick *et al.* 1976; Klimetzek und Francke 1980; Birgersson *et al.* 1988; Birgersson 1989). Von einer hormonellen Steuerung der Produktion und Emission von cis-Verbenol wird ausgegangen (Hughes und Renwick 1977; Birgersson *et al.* 1984), dies ist jedoch noch nicht vollständig untersucht. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die Emission von cis-Verbenol einer jahreszeitlichen Dynamik unterliegt. Ursächlich könnte hierfür die photoperiodisch beeinflusste und hormonell gesteuerte Produktion bzw. Emission von cis-Verbenol sein.

Diskussion:

Die Produktion bzw. Emission von (-)-Verbenon ist ebenfalls abhängig von der Verfügbarkeit der Vorstufe cis-Verbenol (Blomquist *et al.* 2010). Weitere emissionsbeeinflussende Faktoren wurden in der vorliegenden Arbeit überprüft, konnten jedoch keine gesicherte Hinweise über deren grundlegende Beeinflussung der (-)-Verbenon Produktion bzw. Emission liefern. Jedoch wird davon ausgegangen, dass (-)-Verbenon aufgrund der beobachteten geringen Emission sowie den Hinweisen aus der Literatur (Niemeyer *et al.* 1995; Jakus *et al.* 2003) einen kleinräumigen Wirkungsradius hat und dadurch zur Erreichung einer optimalen Besiedlungsdichte an einem Wirt beiträgt.

Die Ergebnisse der drei oben beschriebenen Untersuchungen zur Variabilität der Emission von (-)- α -Pinen, cis-Verbenol und (-)-Verbenon lassen außerdem folgende Hypothese zu: Nachdem Wirtsbäume von im Frühjahr dispergierenden Käfern befallen wurden, steigt zunächst die Attraktivität der befallenen Bäume durch eine erhöhte Emission von cis-Verbenol. Dieser als Sekundärattraktion beschriebene Attraktivitätsanstieg dient unter anderem der Anlockung von Paarungspartnern (Wermelinger 2004). Anschließend sinkt die cis-Verbenol-Emission. Solch ein Rückgang der cis-Verbenol-Emission wird auch in der Arbeit von Birgersson und Bergström (1989) beschrieben. Auffällig war nun ein erneuter Anstieg der cis-Verbenol-Emission. Hier kann die Frage gestellt werden, welche ökologischen Auswirkungen dieser Anstieg hat. Bedingt durch die attraktive Wirkung von cis-Verbenol könnte der erneute Emissionsanstieg die Attraktivität befallener Fichten erneut steigern. Nun kann dies Käfern dienen, die zur Geschwisterbrut ausgeflogen sind. Ihnen ist es durchaus möglich eine Geschwisterbrut in Bäumen anzulegen, in denen bereits Käfer während der Frühjahresdispersion eine Brut angelegt haben. Zur Minimierung der Risiken während des erneuten Ausfluges sind sie sogar auf eine Pheromonquelle in der Nähe ihres Ausflugortes angewiesen (Anderbrant 1989). Weiterhin kann die Emission von Kommunikationsstoffen auch während der Entwicklungsphase der Brut zu dessen Vorteil sein. Durch den repellenten Effekt der Kommunikationsstoffe auf konkurrierende Arten werden diese von bereits besiedelten Bäumen ferngehalten bzw. auf einem Wirt umgelenkt und somit durch Verminderung der Konkurrenz der Entwicklungserfolg der Brut gesteigert. Solche Phänomene werden zum Beispiel für *I. typographus* und *I. duplicatus* (Schlyter und Anderbrant 1993) oder *I. pini* und *D. ponderosae* (Rankin und Borden 1991) beschrieben. Als negative Auswirkung für die Brut kann es jedoch durch die Abgabe von Kommunikationsstoffen auch zur Anlockung von Antagonisten wie Schlupfwespen, Bunkäfern und räuberischen Fliegen kommen (Hedgren und Schroeder 2004; Wermelinger

2004). Kommt es jedoch nicht zu einem übermäßigen Attraktionseffekt von Antagonisten, kann der in der vorliegenden Arbeit festgestellte erneute Anstieg der cis-Verbenol-Emission, bedingt durch die Vorteile für Geschwisterbrut und Larvenentwicklung, ein Populationswachstum fördern. Dies kann zum Erreichen von epidemischen Käferdichten in einem Gebiet beitragen. Das parallel zu cis-Verbenol emittierte und repellent wirkende (-)-Verbenon könnte durch seinen kleinräumigen Wirkungsbereich die Dichte an Wirtsbäumen steuern und so einer intraspezifischen Konkurrenz entgegenwirken. Hierdurch würde die Emission von (-)-Verbenon ebenfalls zum Anwachsen der lokalen Population beitragen.

4.2 Tracheale VOC-Emission

Epidemische Käferdichten können, nachdem das bevorzugte Brutmaterial (geschwächte oder durch Sturm geworfene Fichten) aufgebraucht ist, zu einem Stehendbefall führen. Bei der Besiedlung von vitalen stehenden Bäumen geht man davon aus, dass dem Massenbefall ein zur Pheromonproduktion notwendiger Fraß am Wirt durch Pionierkäfer vorausgeht. Dies bringt die effektiven Abwehrmechanismen potentieller Wirtsbäume zum Erliegen und ermöglicht so eine Besiedlung (Renwick *et al.* 1976; Vité und Francke 1976; Byers 1989; Wermelinger 2004). Bei diesem Besiedlungsszenario gehen die Pionierkäfer ein hohes Risiko ein, da sie direkt mit den effektiven Abwehrmechanismen der Wirtsbäume konfrontiert werden (siehe Abb. 55). Hierzu zählen mechanische Mechanismen wie die Beschaffenheit der Rinde und die Klebrigkeit des Harzes sowie giftige bzw. letale Konzentrationen von Harzkomponenten (Nihoul und Nef 1992; Baier 1996; Rohde 1996; Baier *et al.* 2002; Franceschi 2005). Bisher ist nicht vollständig verstanden, wie diese effektiven Abwehrmechanismen in vitalen stehenden Fichten von den Käfern überwunden werden und es zu einem Stehendbefall kommen kann.

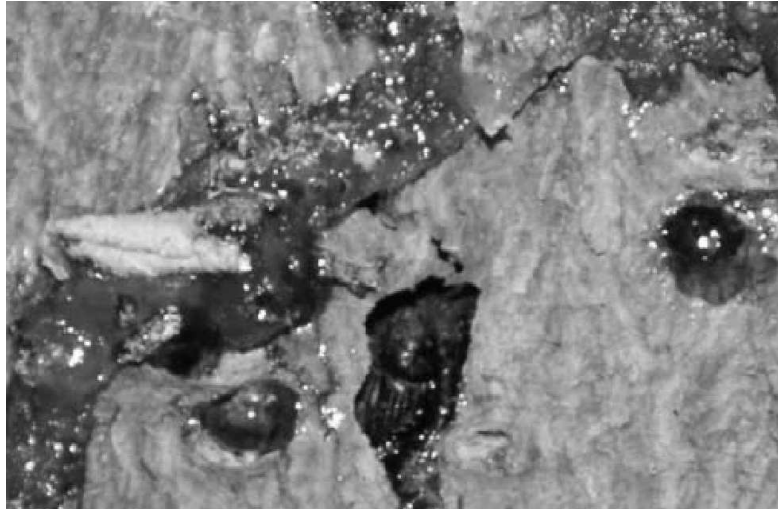


Abb. 55: In Harz verklebter Käfer

Eine Möglichkeit, das hohe Risiko für die einzelnen Pionierkäfer während der Besiedlung zu reduzieren, könnte eine Aggregation von Artgenossen sein, die vor dem Fraß am Wirt stattfindet. Ein nun möglicher etwa zeitgleicher Befall würde die von der Wirtsabwehr ausgehenden Gefahren auf die Gesamtheit der angreifenden Käfer verteilen und somit für einen Vorteil des Individuums sorgen.

Voraussetzungen für solch eine Aggregation wären eine tracheale Aufnahme der notwendigen Vorstufe sowie eine tracheale Abgabe des Aggregationspheromons. Eine Aggregation, die einem Fraß am Wirt vorausgeht, könnte folgendermaßen ablaufen: Zunächst nehmen die Käfer während ihres Dispersionsfluges (-)- α -Pinen, welches aufgrund der ständigen Emission von Fichten in der Waldluft angereichert ist (Janson 1993), über das Tracheensystem auf. Der Aufnahme von (-)- α -Pinen folgt die Umsetzung zu cis-Verbenol sowie dessen tracheale Abgabe. Aufgrund der attraktiven Wirkung von cis-Verbenol auf Artgenossen werden diese angelockt, was zu einer Aggregation führt. Käfer aus der Frühjahrgeneration (F1) könnten bereits beim Ausflug mit einem gewissen cis-Verbenolvorrat ausgestattet sein, da ihre Produktion von cis-Verbenol während der Reifung im Wirt eingesetzt hat (siehe Abb. 32 und Abb. 33).

Diese tracheal eingeleitete Aggregation ermöglicht den oben genannten risikominimierenden zeitgleichen Befall eines potentiellen Wirtes.

4.2.1 Tracheale Emission von cis-Verbenol und (-)-Verbenon

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die tracheale cis-Verbenol-Emission nach trachealer Aufnahme von (-)- α -Pinen überprüft. Hierzu wurden einzelne Käfer in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre inkubiert und anschließend die von den Käfern emittierten VOCs gesammelt und via TD-GC-MS analysiert (siehe 2.5.1). Als Kontrolle dienten Käfer

die keine Behandlung mit (-)- α -Pinen erfahren hatten. Bei dieser Analyse konnte eine signifikant höhere Anzahl an cis-Verbenol emittierenden Käfern bei den Individuen gefunden werden, die mit (-)- α -Pinen inkubiert worden waren (siehe Abb. 38). Mit diesem Ergebnis kann davon ausgegangen werden, dass eine tracheale Abgabe von cis-Verbenol nach trachealer Aufnahme von (-)- α -Pinen möglich ist. Als repellent wirkende Pheromonkomponente sowie als Oxidationsprodukt von cis-Verbenol interessierte auch die tracheale Emission von (-)-Verbenon. Auch hier war der Anteil an Individuen, die (-)-Verbenon emittierten, bei den behandelten Käfern höher (siehe Abb. 39). Dieses Ergebnis würde ebenso eine tracheale Emission von (-)-Verbenon vermuten lassen. Zusätzlich zu der Analyse der emittierten Substanzen der Käfer wurden die Käfer, nachdem deren Exhalationsprodukte gesammelt worden waren, in Hexan extrahiert. Bei Extrakten von Käfern, die mit (-)- α -Pinen inkubiert wurden, war der Anteil an Proben, die cis-Verbenol bzw. (-)-Verbenon enthielten, signifikant höher als bei Extrakten von Kontrollkäfern (siehe Abb. 40 und Abb. 41). Die Analyse der Extrakte bestätigt somit, dass eine tracheale Inkubation mit (-)- α -Pinen zu einer Produktion von cis-Verbenol und (-)-Verbenon führt. In den Arbeiten von Klimetzek und Francke (1980), Reddemann (1993) und Bohlander (1996) wurde eine cis-Verbenol-Produktion nach trachealer Aufnahme von (-)- α -Pinen ebenfalls erwähnt. Bei dem Vergleich unbehandelter Individuen zwischen der Exhalationsproduktanalyse (siehe Abb. 38) und der Extraktanalyse (siehe Abb. 40) konnte eine Umkehrung des Verhältnisses von Tieren, die cis-Verbenol emittierten bzw. produzierten, und Individuen, bei denen die emittierten bzw. produzierten cis-Verbenolkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze lagen, festgestellt werden. Hier geht man davon aus, dass unbehandelte Käfer nur geringe Mengen an cis-Verbenol enthielten und diese während der Messung der Exhalationsprodukte bereits hauptsächlich verbraucht waren.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit herausgefunden werden, dass eine Behandlung mit (-)- α -Pinen ebenfalls einen Einfluss auf die emittierten Mengen pro Individuum hatte. Bei inkubierten Individuen wurden pro Käfer signifikant größere Mengen an cis-Verbenol in den Exhalationsproben gefunden als bei den Kontrollen (siehe Abb. 42). Zusätzlich stellte sich in dieser detaillierten Untersuchung der exhalierten VOCs heraus, dass beide Geschlechter zur Emission von cis-Verbenol befähigt waren. Jedoch waren männliche Käfer in der Lage, größere Mengen als Weibchen zu emittieren. In Extrakten der Käfer konnte nur bei Männchen eine erhöhte Produktion an cis-Verbenol festgestellt werden (siehe Abb. 44). Inkubierte Weibchen und unbehandelte Käfer beider Geschlechter unterschieden sich in den produzierten cis-Verbenolmengen nicht. Offensichtlich kommt hier die gleiche Begründung

von oben zu tragen, dass inkubierte Weibchen und unbehandelte Käfer so geringe Mengen an cis-Verbenol enthielten, dass diese während der Messung der Exhalationsprodukte bereits aufgebraucht waren. Von einer erhöhten Produktion von cis-Verbenol auf männlicher Seite wurde auch in der Arbeit von Klimetzek und Francke (1980) berichtet. Da die männlichen Käfer beim Buchdrucker das Pioniergeschlecht darstellen (Birgersson *et al.* 1984), kann es bezüglich der Attraktion von Paarungspartnern gerade für Männchen von Vorteil sein, größere Mengen an cis-Verbenol freisetzen zu können. Neben der Fähigkeit, mehr cis-Verbenol als Weibchen freizusetzen, wurde eine besonders große Spreitung der männlichen cis-Verbenol-Emission festgestellt, bei der eine relativ große Anzahl an Individuen nur wenig cis-Verbenol emittierten und nur wenige Individuen große Mengen an cis-Verbenol freisetzen (siehe Abb. 56). Dieses Ergebnis deckt sich mit Beobachtungen von Birgersson und Kollegen (1988). Gründe für solche Unterschiede können externe Faktoren wie zum Beispiel der Gehalt an (-)- α -Pinen im Wirt sein, es können aber auch interne physiologische Faktoren eine Rolle spielen (Birgersson *et al.* 1984; Birgersson *et al.* 1988; Schlyter und Birgersson 1989).

Eine weitere Erklärung für das Auftreten von Individuen, die in besonderem Maße cis-Verbenol emittieren können, wäre eine neue Definition von Pionierkäfern, die von dem klassischen Verständnis der Pioniere abweicht. Im klassischen Verständnis werden diejenigen Käfer als Pioniere bezeichnet, die einen geeigneten Wirt ausfindig machen und somit zuerst am Wirt erscheinen. Diese Tiere würden sich im Falle des Systems Buchdrucker-Fichte aufgrund der effektiven Abwehrmechanismen der Fichten besonders hohen Risiken aussetzen und es stellt sich die Frage, welchen evolutionären Vorteil diese Individuen dadurch erhalten. Neben dem Vorteil, als erste Individuen am Wirt noch genügend Brutmaterial vorzufinden und somit den eigenen Bruterfolg zu fördern, scheint jedoch das eingegangene Risiko sehr hoch. Bei der in dieser Arbeit neu aufgestellten Pionierkäfertheorie würden Käfer als Pioniere bezeichnet werden, wenn sie in der Lage sind, cis-Verbenol im Vergleich zu Artgenossen in besonderem Maße abzugeben (siehe Abb. 56). Hierdurch wären diese Individuen befähigt eine Aggregation von Artgenossen auszulösen und würden damit einen Massenangriff auf einen Wirt ermöglichen, was den Besiedlungserfolg erhöht. Hier stellt sich die Frage, ob es für eine Aggregation an einem Wirt ausreicht, dass nur wenige Individuen cis-Verbenol in besonderem Maße emittieren können. Beispiele aus der Tierwelt bestätigen, dass nur wenige Individuen, die eine besondere Information haben oder Fähigkeit besitzen, ausreichen um ganze Gruppen zu steuern. Als Beispiel kann hier der Tanz der Honigbiene genannt werden, bei dem nur einzelne Individuen die Information über eine Futterquelle besitzen und durch

Diskussion:

den Tanz diese Informationen mit vielen anderen Nestgenossen austauschen, die anschließend die Quelle aufsuchen (Dornhaus und Chittka 2004). Couzin und Kollegen (2005) behaupten in Ihrer Studie, dass ein relativ kleiner Anteil an „informierten“ Individuen ausreicht, um eine Gruppe zu führen. Somit könnte der kleine beobachtete Anteil an Individuen, die sehr große Mengen an cis-Verbenol freisetzen (siehe Abb. 56), als Pionierkäfer bezeichnet werden.

Um zu überprüfen, ob die vorgefundene Spreitung der VOC-Emission sich in der genetischen Populationsstruktur widerspiegelt, wurde in dieser Arbeit eine Isoenzymanalyse durchgeführt. Hierbei konnten Unterschiede zwischen wenig, mittel und viel produzierenden Individuen gefunden werden, jedoch ließen sich anhand der Isozymanalyse keine Individuen identifizieren, die eine besonders hohe VOC-Emission vorwiesen (siehe Abb. 54 sowie Tab. 12 und Tab. 13). Daher wird eine phänotypische Ursache für die Befähigung, cis-Verbenol in besonderem Maße zu emittieren, angenommen.

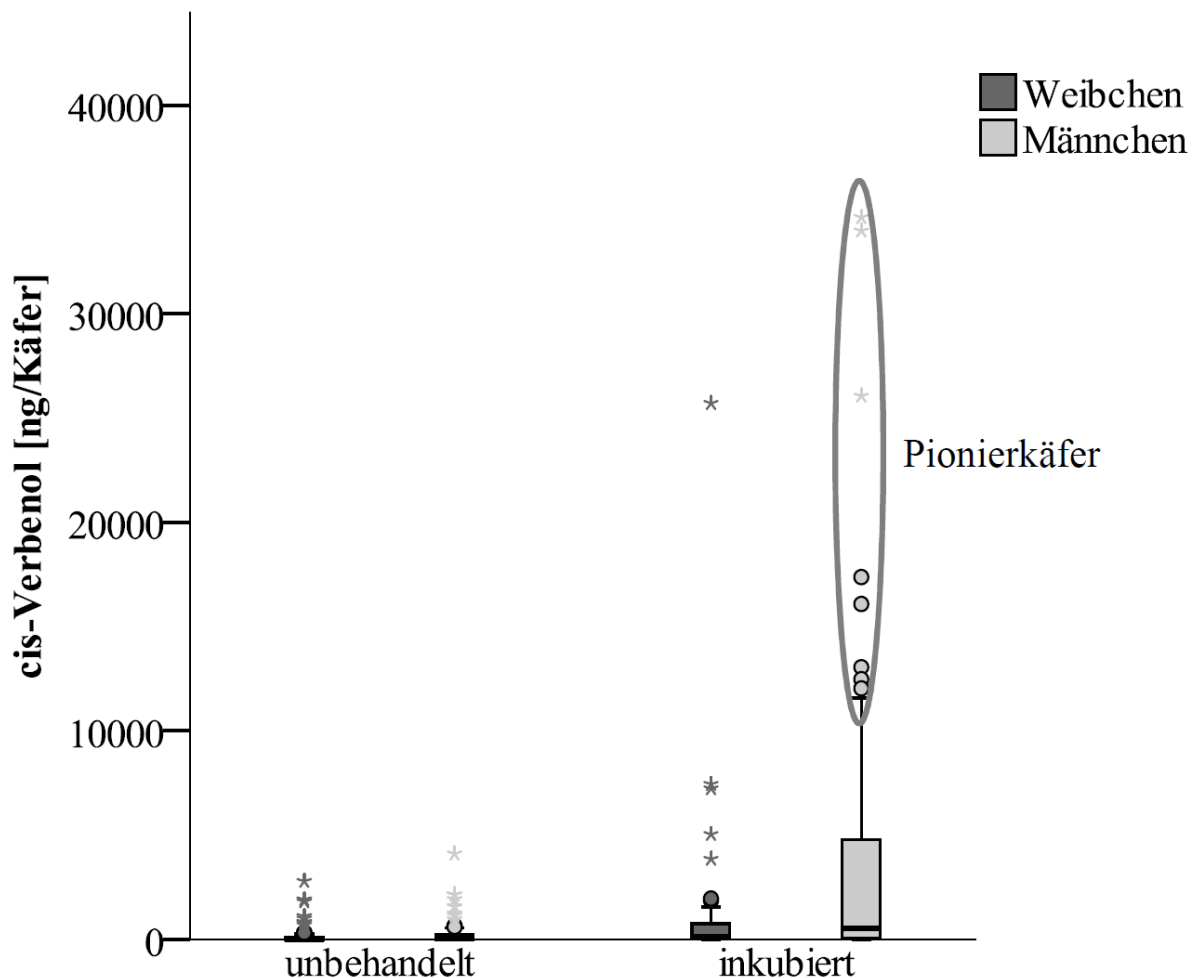


Abb. 56: Mengen an exhalierem cis-Verbenol (in ng pro Käfer) von unbehandelten und inkubierten Käfern. Dargestellt sind Median, obere und untere Quartile, Spannweite und Ausreißer. Ursache für die durch die Ellipse markierten Ausreißer könnten Pionierkäfer sein, welche besonders befähigt sind, cis-Verbenol zu emittieren.

Neben der Analyse zur cis-Verbenol-Emission wurden auch die emittierten Mengen an (-)-Verbenon verglichen. Hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen und den Geschlechtern gefunden werden (siehe Abb. 43). Die Emission von (-)-Verbenon scheint somit nicht alleine durch die Inkubation mit (-)- α -Pinen gesteuert zu werden. Diese Vermutung verstärkt sich mit dem Ergebnis der Extraktanalyse. Hier unterschieden sich Extrakte inkubierter männlicher Käfer signifikant von den Extrakten inkubierter Weibchen sowie von Kontrollextrakten (siehe Abb. 45). Durch diese Ergebnisse kann vermutet werden, dass ein Rückhalte Mechanismus für das repellent wirkende (-)-Verbenon existiert. Eine weitere Erklärung für eine nicht induzierbare (-)-Verbenon-Emission nach trachealer Aufnahme von (-)- α -Pinen, die ebenfalls einen Steuerungsmechanismus zur Emission von (-)-Verbenon voraussetzen würde, wäre der Mangel an Konkurrenz während der Inkubation. In diesem Versuch wurden die Käfer einzeln inkubiert. Demnach gab es keinen Konkurrenzdruck, der zu einer Emission von (-)-Verbenon geführt haben könnte.

Um eine mögliche Produktion von cis-Verbenol und (-)-Verbenon durch Mikroorganismen, die den Käfern anhaften, bzw. durch Autoxidation (Hunt *et al.* 1989; Hunt und Borden 1990) auszuschließen und damit die tracheale Emission der beiden Zielanalyten durch die Käfer zu bestätigen, wurden tote Käfer mit (-)- α -Pinen inkubiert und durch Waschung und Extraktion die Produktion von cis-Verbenol bzw. (-)-Verbenon überprüft (siehe 3.2.2). Hierbei konnte keine Produktion von cis-Verbenol und (-)-Verbenon nachgewiesen werden. Somit können Autoxidation und Mikroorganismen als Synthesemechanismus bzw. Synthesort für die in den oben beschriebenen Versuchen gefundenen cis-Verbenol- und (-)-Verbenonmengen ausgeschlossen werden.

4.2.2 Attraktivität von Buchdruckern, die mit (-)- α -Pinen inkubiert wurden

Der Nachweis der trachealen Emission von cis-Verbenol ist der erste Schritt, der eine Aggregation von Käfern vor der Besiedlung des Wirtes ermöglicht. Ein weiterer wichtiger Schritt ist, dass die emittierten VOCs einen attraktiven Effekt auf Artgenossen ausüben. Dies wurde in zwei Verhaltenstests überprüft (siehe 2.5.3). In einem ersten Test konnten unbehandelte Wahlkäfer in einem Y-Rohr (siehe Abb. 19) zwischen in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre inkubierten und unbehandelten Lockkäfern entscheiden. Es wurden drei Kollektivgrößen von Lockkäfern getestet (ein Käfer, drei Käfer und fünf Käfer). Hier konnte eine Präferenz für inkubierte Käfer bei einer Kollektivgröße von fünf Käfern gefunden werden (siehe Abb. 46). Es wird vermutet, dass die emittierten cis-Verbenol-Mengen bei den

beiden anderen Kollektivgrößen nicht ausreichen, um einen attraktiven Effekt auf die Wahlkäfer auszuüben. In einem zweiten Experiment sollte erneut der Effekt geprüft werden, den Käfer, die (-)- α -Pinen tracheal aufgenommen haben, auf Artgenossen ausüben. Hier konnten sich 12 Wahlkäfer pro Versuchsdurchgang gleichzeitig auf einem statischen Olfaktometer (siehe Abb. 20) zwischen einem leeren Becher, zwischen unbehandelten Lockkäfern und inkubierten Lockkäfern entscheiden. Es wurden zwei Kollektivgrößen an Lockkäfern getestet (drei und fünf Käfer). Die Präferenz für inkubierte Käfer wurde in diesem Experiment erneut bestätigt (siehe Abb. 47). Es konnten signifikant mehr Käfer in den Becher gefunden werden, in denen sich inkubierte Lockkäfer befanden. Es bleibt hier jedoch zu beachten, dass nur die Käfer in die Statistik mit eingingen, die sich auch entschieden hatten. Ein Großteil der Käfer drehte sich während dem Experiment auf den Rücken, so dass ihnen eine Entscheidung nicht mehr möglich war, oder befanden sich bewegungslos am Rand des Olfaktometers. Trotz dieses großen Anteils an „unentschiedenen Wahlkäfern“ wird in der Untersuchung davon ausgegangen, dass die inkubierten Lockkäfer einen attraktiven Effekt auf die Wahlkäfer hatten. Die in den Bechern gefundenen Wahlkäfer mussten aufgrund einer 6mm schmalen Öffnung, die ein zufälliges Abstürzen der Käfer in die Becher verhinderte (siehe Abb. 20), bewusst und somit nach einer Entscheidung durch die Öffnung krabbeln. Aufgrund der Notwendigkeit einer aktiven Entscheidung kann von einem Effekt der Lockkäfer ausgegangen werden.

4.2.3 Einfluss der Käferdichte auf die tracheale Emission von VOCs

Mit dem Nachweis, dass die emittierten Substanzen nach einer trachealen Aufnahme von (-)- α -Pinen einen attraktiven Effekt auf Artgenossen ausüben, ist die Voraussetzung für eine Aggregation von Artgenossen noch vor einem Fraß am Wirt gegeben. Zur Vermeidung von zu hohen Käferdichten könnte auch hier schon eine Dichteregulierung stattfinden, da nicht nur das attraktiv wirkende cis-Verbenol, sondern auch das repellent wirkende (-)-Verbenon (Schlyter *et al.* 1989) freigesetzt wird. Bei einer Dichteregulierung außerhalb des Wirtes könnten neben olfaktorischen Signalen auch taktile bzw. visuelle Signale den einzelnen Käfern als Dichteanzeiger dienen. Visuelle Signale werden bereits in dem Review von Byers (1989) zur Regulierung der Einbohrdichte am Wirt erwähnt.

In einem weiteren Laborversuch sollte eine mögliche Dichteregulierung durch vermehrte Abgabe von (-)-Verbenon bei höherer Käferdichte und mit visueller bzw. taktiler Interaktionsmöglichkeit untersucht werden. Hierzu wurden Käfer in drei Kollektivgrößen (ein Käfer, drei Käfer und sechs Käfer) in einer künstlichen (-)- α -Pinenatmosphäre inkubiert und

die emittierten VOC-Mengen verglichen (siehe 2.5.4). Hierbei konnte ein Anstieg des in dieser Arbeit verwendeten Repellentsmaßes (gemessene (-)-Verbenonkonzentration pro gemessener cis-Verbenolkonzentration) bei einer gleichzeitigen Inkubation von sechs Käfern festgestellt werden (siehe Abb. 48). Dieses Ergebnis lässt sich dadurch erklären, dass die pro Käfer emittierte (-)-Verbenonmenge bei dem Käferkollektiv aus sechs Artgenossen signifikant höher war als bei den beiden anderen Käferkollektivgrößen (siehe Abb. 50). Zudem unterschied sich die emittierte cis-Verbenolmenge pro Käfer zwischen den drei Käferkollektiven nicht (siehe Abb. 49). Demnach könnte eine Dichteregulierung auch außerhalb des Wirtes stattfinden. Käfer, die durch die tracheale Emission von cis-Verbenol aggregieren, könnten durch olfaktorische aber auch taktile und visuelle Signale einen Stimulus zur Emission von (-)-Verbenon erhalten. Die Emission von (-)-Verbenon würde der attraktiven Wirkung von cis-Verbenol entgegenwirken und so eine übermäßige Aggregation verhindern.

Auch in diesem Versuch wurden die Käferkollektive, nachdem die Exhalationsprodukte gesammelt wurden, in Hexan extrahiert. Diese Analyse ergab, dass bei dem Kollektiv aus sechs Artgenossen die vorhandenen Mengen an (-)-Verbenon während der Exhalationsproduktmessung nahezu aufgebraucht wurden (siehe Abb. 53), was sich auch in dem Verhältnis von produziertem (-)-Verbenon zu cis-Verbenol widerspiegelte (siehe Abb. 51). Bei den beiden anderen Kollektivgrößen war das Ergebnis genau umgekehrt. Hier konnte noch (-)-Verbenon in den Extrakten nachgewiesen werden (siehe Abb. 53), da bei der Exhalationsproduktmessung kaum (-)-Verbenon abgegeben wurde (siehe Abb. 50). Diese Ergebnisse bekräftigen die Vermutung, dass es zu einer Dichteregulierung außerhalb des Wirtes kommen kann, da es bei allen drei hier verwendeten Käferdichten zu einer Produktion von (-)-Verbenon nach trachealer (-)- α -Pinenaufnahme kam, es jedoch nur bei der höchsten Käferdichte emittiert wurde. Dies kann weiterhin als Hinweis für eine aktive Steuerung der (-)-Verbenon-Emission gesehen werden.

4.2.4 Schlussfolgerung zur trachealen VOC-Emission

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur trachealen Emission von VOCs deuten darauf hin, dass eine Aggregation von Buchdruckern vor dem Fraß am Wirt möglich sein könnte. Die hier neu definierten Pionierkäfer würden hierbei zunächst durch eine übermäßige Abgabe von cis-Verbenol Artgenossen anlocken. Da diese auch zu einer trachealen Abgabe von cis-Verbenol nach trachealer Vorstufenaufnahme befähigt sind, verstärkt sich das attraktive Signal mit jedem neu hinzukommenden Käfer. Somit kommt es zu einer Aggregation von

Diskussion:

Artgenossen und ein etwa zeitgleicher Befall eines potentiellen Wirts könnte erfolgen. Zusätzlich könnte durch die Abgabe des repellent wirkenden (-)-Verbenon, dessen Abgabe offensichtlich dichteabhängig ist, eine Regulation der Käferdichte bereits während diesen Stadiums der Wirtsbesiedlung stattfinden.

5 Zusammenfassung:

Auf die primäre Besiedlung geeigneter Wirtsbäume des Buchdruckers folgt die sogenannte Sekundärattraktion. Hier werden durch die Pionierkäfer volatile Substanzen freigesetzt, die zu einer Aggregation von Käfern beider Geschlechter am Wirt führen. Als fernwirkender Lockstoff spielt bei dieser sekundären Attraktion cis-Verbenol eine bedeutende Rolle. Cis-Verbenol entsteht als Oxidationsprodukt aus (-)- α -Pinen, das als wesentlicher Bestandteil des Fichtenharzes von den Käfern während des Fraßes im Bast oral oder über das Tracheensystem aufgenommen wird. Da (-)- α -Pinen für die Käfer giftig ist, kann die Oxidation zu cis-Verbenol auch als Entgiftungsprozess bezeichnet werden. Die Oxidation von cis-Verbenol führt zu (-)-Verbenon, was durch seinen repellenten Effekt die Regulierung der Käferdichte am Wirt steuert. Bislang gibt es Studien, die die Emission volatiler Substanzen an befallenen Fichten während der ersten Befallswoche untersuchten. Hierbei konnte zu Beginn des Befalls ein Anstieg der Emission von cis-Verbenol beobachtet werden, die am Ende der ersten Befallswoche zurück ging. Aufgrund der Entgiftung des auch während des Entwicklungsfraßes von Larven und Käfern aufgenommenen (-)- α -Pinsens ist davon auszugehen, dass auch nach der ersten Befallswoche die beiden beschriebenen Kommunikationsstoffe an befallenen Fichten freigesetzt werden. Hierzu gibt es jedoch noch keine Untersuchungen.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher Untersuchungen zur Emission von (-)- α -Pinen, cis-Verbenol und (-)-Verbenon an liegenden befallenen Fichten im Freiland und an befallenen Rindenstücken im Labor während eines gesamten Befallsverlaufs durchgeführt. Jeder der drei Zielanalyten zeigte ein spezifisches Emissionsmuster, für die in dieser Arbeit Erklärungsansätze gefunden wurden. Hierbei scheint die Emission von (-)- α -Pinen hauptsächlich durch den Fraß von Parentalkäfern und Larven und den hierdurch verursachten Verletzungen von Harzgefäßen im Bast beeinflusst zu werden. Bei cis-Verbenol konnten zwei Effekte beobachtet werden, die die Emission in besonderem Maße beeinflussten. Grundlegend scheint der Entgiftungsprozess während der Fraßaktivität in den jeweils vorherrschenden Entwicklungsstadien für die Freisetzung von cis-Verbenol zu sein. Zusätzlich scheinen der Jahresgang und die hiermit verbundene Photoperiode die Emission von Cis-Verbenol zu beeinflussen. Denn bei Fichten die während der Anlage der F1-Generation befallen wurden, stieg die cis-Verbenol-Emission zum Zeitpunkt der Larvenentwicklung an. Solch ein Anstieg wurde ebenfalls in dem Laborversuch beobachtet. Hingegen an Fichten, die von Käfern zur Anlage der F2-Generation befallen wurden, nahm die Emission von cis-Verbenol mit voranschreitender Zeit ab. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Brut, die durch die

Zusammenfassung:

Photoperiode auf eine bevorstehende Dispersion eingestellt ist, ihre Produktion und Emission von cis-Verbenol erhöht, wohingegen Individuen denen eine Diapause bevorsteht, ihre Produktion und Emission von cis-Verbenol auf das Maß der Entgiftung reduzieren. Die für (-)-Verbenon überprüften emissionsbeeinflussenden Faktoren konnten die in der vorliegenden Arbeit beobachtete niedrige und relativ gleichbleibende Emission von (-)-Verbenon nicht erklären. Zu den Faktoren gehörten die Befallsdichte, die Emission der Vorstufe cis-Verbenol, die vorhandene Konzentration von (-)- α -Pinen im Bast, die Kambialtemperatur sowie der Tagesgang. Daher wird vermutet, dass die Emission von (-)-Verbenon durch eine mögliche autoxidative Produktion sowie durch Mikroorganismen bzw. durch einen physiologischen käferinternen Emissionsmechanismus gesteuert wird.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit die Frage gestellt, wie Buchdrucker die effektiven Abwehrmechanismen vitaler stehender Fichten überwinden können. Hierzu wurde ein hypothetisches Szenario entwickelt, dessen Grundlage eine Aggregation von Artgenossen noch vor der Besiedlung des Wirtes mit einem anschließenden etwa zeitgleichen Befall bildet. Hierdurch könnte das individuelle Risiko während eines Befalls durch die Risikoverteilung auf die Masse reduziert werden. In Laborversuchen konnte gezeigt werden, dass Buchdrucker zuvor tracheal aufgenommenes (-)- α -Pinen zu cis-Verbenol umsetzen und es auch über das Tracheensystem freigeben. Hierbei wurde eine große individuelle Spreitung der Freisetzung beobachtet. Nur wenige Tiere waren befähigt besonders große Mengen an cis-Verbenol zu emittieren. Weiterhin stellte sich heraus, dass nach trachealer Aufnahme von (-)- α -Pinen die tracheal freigesetzten volatilen Substanzen einen attraktiven Effekt auf Artgenossen haben. Diese Ergebnisse bilden die Grundlage für eine Aggregation von Buchdruckern vor einem Befall, bei dem die Individuen, die eine besondere Befähigung der cis-Verbenol-Emission besitzen, als Pioniere bezeichnet werden könnten, da sie durch diese Befähigung eine Aggregation von Artgenossen initiieren. In genetischen Untersuchungen konnte kein Hinweis für eine Differenzierung der soeben genannten Pionierkäfer von den restlichen Käfern gefunden werden. Daher wird eine phänotypische Ursache für die Befähigung, cis-Verbenol in besonderem Maße zu emittieren, angenommen. Zusätzlich stellte sich heraus, dass die tracheale Emission von (-)-Verbenon durch eine Verdichtung von Käfern mit möglicher pheromonalen, taktiler sowie visueller Interaktionen gesteigert werden kann. Zum einen kann dadurch bereits während der Aggregation vor einem Befall eine Dichteregulierung stattfinden und zum anderen ist diese dichteabhängige Freisetzung von (-)-Verbenon ein weiterer Hinweis für einen käferinternen Freisetzungsmechanismus.

6 Summary:

The primary infestation of suitable host trees by pioneer beetles of the European spruce bark beetle is followed by a secondary attraction phase. In this stage, pioneer beetles emit volatile substances, which lead to an aggregation of both sexes at the host. In this secondary attraction process, cis-verbenol plays an important role as long distance attractant. Cis-verbenol is an oxidation product of (-)- α -pinene, a main constituent of European spruce resin. (-)- α -pinene is taken up by the beetles orally, and via the tracheal system while feeding in the phloem. Since (-)- α -pinene is toxic to the beetles, its oxidation to cis-verbenol can be described as a detoxification process. The oxidation of cis-verbenol leads to (-)-verbenone, which regulates the density of arriving beetles at the host by its repellent effect. In previous studies, the emission of volatile substances on infested trees has been investigated during the first week of infestation. These studies described an increase in the cis-verbenol concentration at the beginning of the infestation, followed by a decrease at the end of the first week of infestation. Because of the detoxification of (-)- α -pinene in larvae and beetles, the emission of both communication substances is expected even after the first week of infestation. However, there are no previous studies on this subject.

Therefore, I analysed the emission of (-)- α -pinene, cis-verbenol and (-)-verbenone during a full infestation process on felled and infested trees in field studies, as well as on infested bark pieces in the laboratory. Each of the described substances showed a specific emission pattern. In this dissertation, I provide possible explanations for each of the patterns:

The main factor for the emission of (-)- α -pinene seems to be the injury to the resin ducts which the beetles and larvae cause when feeding in the bast.

Concerning the emission of cis-verbenol, two basic factors were observed. On the one hand, the detoxification process varies with the developmental state of the beetle and the corresponding feeding behavior. On the other hand, the seasonal changes in the photoperiod during the year seem to affect the emission of cis-verbenol. This has been observed on spruces which were infested by the F1 generation. In this case, the cis-verbenol emission increased during the larval development. A similar effect could be observed in laboratory as well. However, on spruces infested by the F2 generation, the emission of cis-verbenol decreased. This suggests that individuals, which are triggered by the photoperiod for dispersion, increase their production and emission of cis-verbenol. Individuals which are triggered to go into diapause, decrease their production and emission of cis-verbenol.

The emission of (-)-verbenone was low and constant. The factors investigated in this study, namely infestation density, emission of the precursor cis-verbenol, concentration of

Summary:

(-)- α -pinene in the phloem, cambial temperature and diurnal variations had no influence on the (-)-verbenone emission. Therefore, it is possible that the emission of (-)-verbenone is influenced by autoxidative production, microorganisms, or controlled by a physiological emission mechanism in the beetle itself.

Furthermore, I investigated how the European spruce bark beetle can overcome the effective defense mechanisms of living spruces. Therefore, I developed a hypothetical scenario, in which an aggregation of conspecifics even before a first contact with the host enables the beetles to perform a simultaneous attack. This so called preattack aggregation reduces the individual risk by distributing it over a large number of beetles.

Laboratory tests showed that beetles produce cis-verbenol, and release it via the tracheal system, when incubated in an (-)- α -pinene atmosphere. There was a high inter-individual variation in the amount of cis-verbenol released by the beetles. Only a few individuals emitted high amounts of cis-verbenol. Additionally, I observed that after a tracheal uptake of (-)- α -pinene, the tracheally emitted volatile substances had an attractive effect on conspecifics. These results provide evidence for the preattack scenario. Individuals with the ability to emit high amounts of cis-verbenol could act as pioneer beetles, because the ability to release cis-verbenol would enable them to initiate an aggregation of conspecifics. Genetic analyses showed no difference between pioneer beetles and their conspecifics, suggesting a phenotypical cause for the ability to emit cis-verbenol in high amounts.

Additionally, I found that the emission of (-)-verbenone increased with higher beetle density, when the beetles had the opportunity of pheromonal, tactile and visual interaction. Thus, the emission of (-)-verbenone could regulate the beetle density during the preattack aggregation. These results provide further evidence for a beetle internal physiological emission mechanism.

Danksagung:

7 Danksagung:

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Schopf für die Möglichkeit bedanken, an seinem Lehrstuhl zu promovieren. Hierbei stand er mir als Doktorvater während jeder Phase der Arbeit zur Seite und hatte seine Bürotür jederzeit für einen Gedankenaustausch geöffnet. Hierdurch konnten viele Fragen geklärt und Hürden überwunden werden.

Frau Prof. Dr. Menzel danke ich für Ihre Bemühungen als zweite Gutachterin dieser Dissertation und Herrn Prof Dr. Oßwald danke ich für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Ein weiterer Dank geht an das Institut für Meteorologie und Klimaforschung Atmosphärische Umweltforschung (IMK-IFU) in Garmisch-Partenkirchen. Hier danke ich Herrn Dr. Steinbrecher nicht nur für die Bereitstellung der künstlichen Nase und des GC-MS Systems, sondern auch für die vielen Tipps und Tricks während Kalibrierung und Anwendung der Systeme. An dieser Stelle seien auch Frank Neidl, Dominik Steigner sowie Benjamin Wolpert gedankt, die mich mit Ihrem Knowhow und ihrer technischen Ausstattung nie im Stich gelassen haben.

Auch Dr. Arthen-Engeland und Andreas Stelter von der Firma Bruker Daltonics bin ich zu großem Dank verpflichtet. Sie unterstützten mich mit ihrem Wissen und ihrer Erfahrung auf dem Gebiet der Gaschromatographie und Massenspektrometrie sowie durch ihre spontane Hilfsbereitschaft.

Ein großer Dank sei auch an die Mitarbeiter und Assoziierten des Nationalparks Bayerischer Wald für deren großzügige Kooperationsbereitschaft ausgesprochen. Ohne deren Bemühungen hätte ein Großteil der vorliegenden Arbeit nicht bearbeitet werden können. Hier möchte ich ganz besonders Dr. Rall, PD Dr. Müller, Frank Steffens, Olaf Schubert und Hennig Rothe danken. Als Mitarbeiter des Forstbetriebes Freising sei auch Stefan Huber gedankt. Durch ihn blieb unsere Borkenkäferzucht am Leben.

Außerdem möchte ich Herrn Dr. Gruppe herzlich für die vielen fruchtbaren Gespräche danken. Herr Dr. Gruppe hatte immer ein offenes Ohr bei Problemen und Fragen. Seine anerkennende Art steigerte stets meine Motivation, was in großem Maße das Gelingen dieser

Danksagung:

Arbeit beeinflusste. Außerdem danke ich ihm für die Unterstützung während der genetischen Untersuchungen.

Weitere Unterstützung erfuhr ich durch Frau Elisabeth Sturm und Frau Christa Langer. Ihr unermüdlicher Einsatz im Labor verhalf mir immer wieder zu Freiraum, weitere Proben im Freiland zu sammeln. Außerdem wurde es durch sie bei der langwierigen Auswertung der Gasproben nie langweilig. Für organisatorische Fragen stand Frau Beate Bayer immer mit Rat und Tat beiseite. Dafür sei ihr recht herzlich gedankt.

Ein besonderer Dank geht an meinen Bürokollegen und Mitbewohner Kai Dworschak. Ihm danke ich für die vielen und meist auch langen motivationsfördernden sowie fragenaufklärenden Gespräche im Büro und unserer WG-Küche. An dieser Stelle möchte ich auch Tobias Zehetmair und Markus Kautz erwähnen, die mich tatkräftig in Werkstadt und Freiland sowie bei GIS-Fragen unterstützten. Allen dreien danke ich für ihre Freundschaft, durch die meine Zeit in Freising sehr positiv in Erinnerung bleiben wird. Auch allen weiteren Kollegen des Lehrstuhls für Tierökologie möchte ich danken, dass sie mich so herzlich in ihrem Kreis aufgenommen haben.

Für ihre unendliche Geduld und dem Verständnis und Interesse meiner Arbeit gegenüber danke ich meiner Frau Jutta Perkert. Ohne ihren Rückhalt wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Unserer Tochter Laura danke ich dafür, dass sie mich durch ihr Lächeln und ihre angenehme Art immer wieder aufgemuntert hat. Bei meinen Eltern und meiner restlichen Familie möchte ich mich bedanken, dass sie mir immer beigestanden haben und ich daher derjenige werden konnte, der ich jetzt bin.

Vielen herzlichen Dank!!!

8 Literaturverzeichnis:

- Anderbrant, O. 1989. Reemergence and 2nd brood in the bark beetle *Ips typographus*. *Holarctic Ecology* 12(4):494-500.
- Anderbrant, O., Schlyter, F., Birgersson, G. 1985. Intraspecific competition affecting parents and offspring in the bark beetle *Ips typographus*. *Oikos* 45(1):89-98.
- Andersson, M.N., Larsson, M.C., Schlyter, F. 2009. Specificity and redundancy in the olfactory system of the bark beetle *Ips typographus*: Single-cell responses to ecologically relevant odors. *Journal of Insect Physiology* 55(6):556-567.
- Baier, P. 1996. Defence reactions of Norway spruce (*Picea abies* Karst) to controlled attacks of *Ips typographus* (L) (Col, Scolytidae) in relation to tree parameters. *Journal of Applied Entomology* 120(10):587-593.
- Baier, P., Führer, E., Kirisits, T., Rosner, S. 2002. Defence reactions of Norway spruce against bark beetles and the associated fungus *Ceratocystis polonica* in secondary pure and mixed species stands. *Forest Ecology and Management* 159(1-2):73-86.
- Bakke, A. 1976. Spruce bark beetle, *Ips typographus* - pheromone production and field response to synthetic pheromones. *Naturwissenschaften* 63(2):92-92.
- Bakke, A. 1981. Inhibition of the response in *Ips typographus* to the aggregation pheromone - field-evaluation of verbenone and ipsenol. *Journal of Applied Entomology* 92(2):172-177.
- Bakke, A., Froyen, P., Skattebol, L. 1977. Field response to a new pheromonal compound isolated from *Ips typographus*. *Naturwissenschaften* 64(2):98-99.
- Bässler, C. 2004. Das Klima im Nationalpark Bayerischer Wald - Darstellung, Entwicklung und Auswirkung. In: Wald, N.B., editor. Grafenau.
- Bässler, C., Förster, F., Moning, C., Müller, J. 2009. The BIOKLIM Project: Biodiversity research between climate change and wilding in a temperate montane forest - The conceptual framework. *Waldökologie, Landschaftsforschung und Naturschutz* 7:21-34.
- Bearfield, J.C., Henry, A.G., Tittiger, C., Blomquist, G.J., Ginzl, M.D. 2009. Two regulatory mechanisms of monoterpene pheromone production in *Ips* spp. of bark beetles. *Journal of Chemical Ecology* 35(6):689-697.
- Bergstrom, G. 2007. Chemical ecology = chemistry plus ecology! *Pure and Applied Chemistry* 79(12):2305-2323.
- Bhattacharyya, P.K., Prema, B.R., Kulkarni, B.D., Pradhan, S.K. 1960. Microbiological transformation of terpenes - hydroxylation of α -pinene. *Nature* 187(4738):689-690.

- Bierl, B.A., Beroza, M., Collier, C.W. 1970. Potent sex attractant of gypsy moth - its isolation, identification, and synthesis. *Science* 170(3953):87-89.
- Birgersson, G. 1989. Host tree resistance influencing pheromone production in *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae). *Holarctic Ecology* 12(4):451-456.
- Birgersson, G., Bergström, G. 1989. Volatiles released from individual spruce bark beetle entrance holes - quantitative variations during the 1st week of attack. *Journal of Chemical Ecology* 15(10):2465-2483.
- Birgersson, G., Schlyter, F., Bergström, G., Löfqvist, J. 1988. Individual variation in aggregation pheromone content of the bark beetle, *Ips typographus*. *Journal of Chemical Ecology* 14(9):1737-1761.
- Birgersson, G., Schlyter, F., Löfqvist, J., Bergström, G. 1984. Quantitative variation of pheromone components in the spruce bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae) from different attack phases. *Journal of Chemical Ecology* 10(7):1029-1055.
- Blomquist, G.J., Figueroa-Teran, R., Mory, A., Song, M.M., Gorzalski, A., Abbott, N.L., Chang, E., Tittiger, C. 2010. Pheromone production in bark beetles. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 40(10):699-712.
- Blum, M.S. 1996. Semiochemical parsimony in the Arthropoda. *Annual Review of Entomology* 41:353-374.
- Bohlander, F. 1996. Zum energetischen Status des Buchdruckers *Ips typographus* L. (Coleoptera, Scolytidae) [Dissertation]. München: Ludwig-Maximilians-Universität. 189 p.
- Borgkarlson, A.K., Lindström, M., Norin, T., Persson, M., Valterova, I. 1993. Enantiomeric composition of monoterpene hydrocarbons in different tissues of Norway spruce, *Picea abies* (L) Karst - a multidimensional gas-chromatography study. *Acta Chemica Scandinavica* 47(2):138-144.
- Breed, M.D. 1998. Recognition pheromones of the honey bee. *Bioscience* 48(6):463-470.
- Byers, J.A. 1981. Pheromone biosynthesis in the bark beetle, *Ips paraconfusus*, during feeding or exposure to vapors of host plant precursors. *Insect Biochemistry* 11(5):563-569.
- Byers, J.A. 1989. Chemical ecology of bark beetles. *Experientia* 45(3):271-283.
- Byers, J.A. 1993. Avoidance of competition by spruce bark beetles, *Ips typographus* and *Pityogenes chalcographus*. *Experientia* 49(3):272-275.

- Couzin, I.D., Krause, J., Franks, N.R., Levin, S.A. 2005. Effective leadership and decision-making in animal groups on the move. *Nature* 433(7025):513-6.
- Dettmer, K., Engewald, W. 2002. Adsorbent materials commonly used in air analysis for adsorptive enrichment and thermal desorption of volatile organic compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*(6):490-500.
- Diaz, E., Cisneros, R., Zuniga, G. 2000. Comparative anatomical and histological study of the alimentary canal of the *Dendroctonus frontalis* (Coleoptera : Scolytidae) complex. *Annals of the Entomological Society of America* 93(2):303-311.
- Dolezal, P., Sehnal, F. 2007. Effects of photoperiod and temperature on the development and diapause of the bark beetle *Ips typographus*. *Journal of Applied Entomology* 131(3):165-173.
- Dornhaus, A., Chittka, L. 2004. Why do honey bees dance? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 55(4):395-401.
- Dworschak, K., Fahse, L., Gruppe, A., Immler, T., Kraft, M., Kühn, R., Lobinger, G., Petercord, R., Schopf, R., Stoeckle, B.C. 2011. Analyse der Borkenkäfersituation in den Nationalparks Bayerischer Wald und Berchtesgaden (Borkenkäfer-Dispersion). Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit
- Eisner, T., Eisner, M., Rossini, C., Iyengar, V.K., Roach, B.L., Benedikt, E., Meinwald, J. 2000. Chemical defense against predation in an insect egg. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(4):1634-1639.
- Elling, W., Bauer, E., Klemm, G., Koch, H. 1987. Klima und Böden - Waldstandorte. Wissenschaftliche Schriftenreihe des Bayerischen Staatsministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten 1:255.
- Erbilgin, N., Krokene, P., Kvamme, T., Christiansen, E. 2007. A host monoterpene influences *Ips typographus* (Coleoptera : Curculionidae, Scolytinae) responses to its aggregation pheromone. *Agricultural and Forest Entomology* 9(2):135-140.
- Eriksson, M., Pouttu, A., Roininen, H. 2005. The influence of windthrow area and timber characteristics on colonization of wind-felled spruces by *Ips typographus* (L.). *Forest Ecology and Management* 216(1-3):105-116.
- Faccoli, M. 2009. Effect of weather on *Ips typographus* (Coleoptera Curculionidae) phenology, voltinism, and associated spruce mortality in the southeastern alps. *Environmental Entomology* 38(2):307-316.

- Faccoli, M., Bernardinelli, I. 2011. Breeding performance of the second generation in some bivoltine populations of *Ips typographus* (Coleoptera Curculionidae) in the south-eastern Alps. *Journal of Pest Science* 84(1):15-23.
- Faccoli, M., Stergulc, F. 2004. *Ips typographus* (L.) pheromone trapping in south Alps: spring catches determine damage thresholds. *Journal of Applied Entomology* 128(4):307-311.
- Fink, A.H., Brucher, T., Ermert, V., Kruger, A., Pinto, J.G. 2009. The European storm Kyrill in january 2007: synoptic evolution, meteorological impacts and some considerations with respect to climate change. *Natural Hazards and Earth System Sciences* 9(2):405-423.
- Forster, B., Meier, F., Gall, R. 2003. Bark beetle management after a mass attack - Some Swiss experiences. McManus, M.L.*et al.*, editors. 10-15 p.
- Franceschi, V.R., Krokene, P., Christiansen, E., Krekling, T. 2005. Anatomical and chemical defenses of conifer bark against bark beetles and other pests. *New Phytologist* 167:353-376.
- Führer, E., Hausmann, B., Wiener, L. 1991. Bark beetle (Col, Scolytidae) colonization and terpene patterns in the bark of Norway spruce (*Picea abies* Karst) trap trees. *Journal of Applied Entomology* 112(2):113-123.
- Gilbert, M., Nageleisen, L.M., Franklin, A., Gregoire, J.C. 2005. Post-storm surveys reveal large-scale spatial patterns and influences of site factors, forest structure and diversity in endemic bark-beetle populations. *Landscape Ecology* 20(1):35-49.
- Gugerli, F., Gall, R., Meier, F., Wermelinger, B. 2008. Pronounced fluctuations of spruce bark beetle (Scolytinae: *Ips typographus*) populations do not invoke genetic differentiation *Forest Ecology and Management* 256:405-409.
- Harborne, J.B. 1993. Advances in chemical ecology. *Natural Product Reports* 10(4):327-348.
- Harding, S., Ravn, H.P. 1985. Seasonal activity of *Ips typographus* L (Col, Scolytidae) in Denmark. *Journal of Applied Entomology* 99(2):123-131.
- Hedgren, P.O., Schroeder, L.M. 2004. Reproductive success of the spruce bark beetle *Ips typographus* (L.) and occurrence of associated species: a comparison between standing beetle-killed trees and cut trees. *Forest Ecology and Management* 203(1-3):241-250.
- Hölldobler, B., Wilson, E.O. 1990. The ants. Cambridge, Mass.: Harvard University Press. 732 p.
- Huber, D.P.W., Erickson, M.L., Leutenegger, C.M., Bohlmann, J., Seybold, S.J. 2007. Isolation and extreme sex-specific expression of cytochrome P450 genes in the bark

- beetle, *Ips paraconfusus*, following feeding on the phloem of host ponderosa pine, *Pinus ponderosa*. *Insect Molecular Biology* 16(3):335-349.
- Hughes, P.R., Renwick, J.a.A. 1977. Neural and hormonal control of pheromone biosynthesis in bark beetle, *Ips paraconfusus*. *Physiological Entomology* 2(2):117-123.
- Hunt, D.W.A., Borden, B.S., Lindgren, B.S., Gries, G. 1989. The role of autoxidation of α -pinene in the production of pheromones of *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera: Scolytidae). *Canadian Journal of Forest Research* 19:1275-1282.
- Hunt, D.W.A., Borden, J.H. 1990. Conversion of verbenols to verbenone by yeasts isolated from *Dendroctonus ponderosae* (Coleoptera, Scolytidae). *Journal of Chemical Ecology* 16(4):1385-1397.
- Ivarsson, P., Tittiger, C., Blomquist, C., Borgeson, C.E., Seybold, S.J., Blomquist, G.J., Hogberg, H.E. 1998. Pheromone precursor synthesis is localized in the metathorax of *Ips paraconfusus* Lanier (Coleoptera : Scolytidae). *Naturwissenschaften* 85(10):507-511.
- Jakus, R., Schlyter, F., Zhang, Q.H., Blazenec, M., Vavercak, R., Grodzki, W., Brutovsky, D., Lajzova, E., Turcani, M., Bengtsson, M., Blum, Z., Gregoire, J.C. 2003. Overview of development of an anti-attractant based technology for spruce protection against *Ips typographus*: From past failures to future success. *Anzeiger Fur Schadlingskunde-Journal of Pest Science* 76(4):89-99.
- Janson, R.W. 1993. Monoterpene emissions from Scots pine and Norwegian spruce. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres* 98(D2):2839-2850.
- Jonsson, A.M., Harding, S., Krokene, P., Lange, H., Lindelow, A., Okland, B., Ravn, H.P., Schroeder, L.M. 2011. Modelling the potential impact of global warming on *Ips typographus* voltinism and reproductive diapause. *Climatic Change* 109(3-4):695-718.
- Kausrud, K.L., Gregoire, J.C., Skarpaas, O., Erbilgin, N., Gilbert, M., Okland, B., Stenseth, N.C. 2011. Trees wanted - dead or alive! Host selection and population dynamics in tree-killing bark beetles. *Plos One* 6(5).
- Kautz, M., Dworschak, K., Gruppe, A., Schopf, R. 2011. Quantifying spatio-temporal dispersion of bark beetle infestations in epidemic and non-epidemic conditions. *Forest Ecology and Management* 262(4):598-608.
- Klaus, M., Holsten, A., Hostert, P., Kropp, J.P. 2011. Integrated methodology to assess windthrow impacts on forest stands under climate change. *Forest Ecology and Management* 261(11):1799-1810.

- Klimetzek, D., Francke, W. 1980. Relationship between the enantiomeric composition of α -pinene in host trees and the production of verbenols in *Ips* species. *Experientia* (Basel) 36(12):1343-1345.
- Komonen, A., Schroeder, L.M., Weslien, J. 2011. *Ips typographus* population development after a severe storm in a nature reserve in southern Sweden. *Journal of Applied Entomology* 135(1-2):132-141.
- Lanne, B.S., Ivarsson, P., Johnsson, P., Bergström, G., Wassgren, A.B. 1989. Biosynthesis of 2-methyl-3-buten-2-ol, a pheromone component of *Ips typographus* (Coleoptera, Scolytidae). *Insect Biochemistry* 19(2):163-167.
- Lehmberg, L., Dworschak, K., Bluthgen, N. 2008. Defensive behavior and chemical deterrence against ants in the stingless bee genus *Trigona* (Apidae, Meliponini). *Journal of Apicultural Research* 47(1):17-21.
- Leufven, A., Bergström, G., Falsen, E. 1984. Interconversion of verbenols and verbenone by identified yeasts isolated from the spruce bark beetle *Ips typographus*. *Journal of Chemical Ecology* 10(9):1349-1361.
- Lindelöw, A., Risberg, B. 1992. Attraction during flight of scolytids and other bark- and wood-dwelling beetles to volatiles from fresh and stored spruce wood. *Canadian Journal of Forest Research* 22(2):224-228.
- Lindelöw, A., Schroeder, M. 2001. Spruce bark beetle, *Ips typographus* (L.), in Sweden: Monitoring and risk assessment. *Journal of Forest Science* (Prague) 47(Special Issue 2):40-42.
- Macias, F.A., Galindo, J.L.G., Galindo, J.C.G. 2007. Evolution and current status of ecological phytochemistry. *Phytochemistry* 68(22-24):2917-2936.
- Mayer, H., Schindler, D. 2002. Forest meteorological fundamentals of storm damages in forests in connection with the extreme storm "Lothar". *Allgemeine Forst und Jagdzeitung* 173(11-12):200-208.
- Merker, E., Wild, M. 1954. Das Reifen der Geschlechtsdrüsen bei dem großen Fichtenborkenkäfer und sein Einfluß auf das Verhalten der Tiere. *Beiträge zur Entomologie* 4:451-468.
- Mulock, P., Christiansen, E. 1986. The threshold of successful attack by *Ips typographus* on *Picea abies* - a field experiment. *Forest Ecology and Management* 14(2):125-132.
- Nagy, N.E., Franceschi, V.R., Solheim, H., Krekling, T., Christiansen, E. 2000. Wound-induced traumatic resin duct development in stems of Norway spruce (Pinaceae): Anatomy and cytochemical traits. *American Journal of Botany* 87(3):302-313.

- Nardi, J.B., Young, A.G., Ujhelyi, E., Tittiger, C., Lehane, M.J., Blomquist, G.J. 2002. Specialization of midgut cells for synthesis of male isoprenoid pheromone components in two scolytid beetles, *Dendroctonus jeffreyi* and *Ips pini*. *Tissue & Cell* 34(4):221-231.
- Niemeyer, H., Lenarduzzi, M., Watzek, G. 1995. Effects of verbenone on the spruce bark beetle *Ips typographus* L (Col, Scolytidae). *Anzeiger Für Schädlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz* 68(8):182-186.
- Nihoul, P., Nef, L. 1992. Anatomical characteristics of Norway spruce bark (*Picea abies* Karst.) and the intensity of *Ips typographus* L. attacks (Col., Scolytidae). *Journal of Applied Entomology* 114:26-31.
- Noack, E.M. 1979. Witterung und Klima im Bayerischen Wald. *Wissenschaftliche Schriftenreihe des Bayerischen Staatsministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten* 5:132.
- Pener, M.P. 1992. Environmental cues, endocrine factors, and reproductive diapause in male insects. *Chronobiology International* 9(2):102-113.
- Pureswaran, D.S., Sullivan, B.T. 2012. Semiochemical emission from individual galleries of the southern pine beetle, (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae), attacking standing trees. *Journal of Economic Entomology* 105(1):140-148.
- Rall, H. 1995. Die Wälder im Nationalpark Bayerischer Wald: Von forstwirtschaftlicher Prägung zur natürlichen Entwicklung. Passau: Nationalparkverwaltung Bayerischer Wald.
- Rankin, L.J., Borden, J.H. 1991. Competitive interactions between the mountain pine beetle and the pine engraver in lodgepole pine. *Canadian Journal of Forest Research-Revue Canadienne De Recherche Forestiere* 21(7):1029-1036.
- Reddemann, J. 1993. Monoterpenkohlenwasserstoffe in der Aggregation von *Ips typographus* L. (Coleoptera: Scolytidae) [Dissertation]. München: Ludwig-Maximilians-Universität. 134 p.
- Reddemann, J., Schopf, R. 1996. The importance of monoterpenes in the aggregation of the spruce bark beetle *Ips typographus* (Coleoptera: Scolytidae: Ipinae). *Entomologia Generalis* 21(1-2):69-80.
- Reddy, G.V.P., Guerrero, A. 2004. Interactions of insect pheromones and plant semiochemicals. *Trends in Plant Science* 9(5):253-261.
- Regnier, F.E., Law, J.H. 1968. Insect pheromones. *Journal of Lipid Research* 9(5):541-551.

- Renwick, J.A., Hughes, P.R., Krull, I.S. 1976. Selective production of cis- and trans-verbenol from (-)-and (+)- α -pinene by a bark beetle. *Science* 191(4223):199-201.
- Rohde, M., Waldmann, R., Lunderstädt, J. 1996. Induced defence reaction in the phloem of spruce (*Picea abies*) and larch (*Larix decidua*) after attack by *Ips typographus* and *Ips cembrae*. *Forest Ecology and Management* 86:51-59.
- Rosner, S., Kartusch, B. 2003. Structural changes in primary lenticels of Norway spruce over the seasons. *Iawa Journal* 24(2):105-116.
- Rouault, G., Candau, J.N., Lieutier, F., Nageleisen, L.M., Martin, J.C., Warzee, N. 2006. Effects of drought and heat on forest insect populations in relation to the 2003 drought in Western Europe. *Annals of Forest Science* 63(6):613-624.
- Rudinsky, J.A. 1966. Host selection and invasion by douglas fir beetle *Dendroctonus pseudotsugae* hopkins in coastal douglas fir forests. *Canadian Entomologist* 98(1):98.
- Rudinsky, J.A., Novak, V., Svihra, P. 1971. Attraction of the bark beetle *Ips typographus* L. to terpenes and male-produced pheromone. *Journal of Applied Entomology* 67:179-188.
- Schlyter, F., Anderbrant, O. 1989. Mass attack of trees by *Ips typographus* Induced by sex specific pheromone - a model of attack dynamics. *Holarctic Ecology* 12(4):415-426.
- Schlyter, F., Anderbrant, O. 1993. Competition and niche separation between 2 bark beetles - existence and mechanisms. *Oikos* 68(3):437-447.
- Schlyter, F., Birgersson, G. 1989. Individual variation in bark beetle and moth pheromones - a comparison and an evolutionary background. *Holarctic Ecology* 12(4):457-465.
- Schlyter, F., Birgersson, G., Leufven, A. 1989. Inhibition of attraction to aggregation pheromone by verbenone and ipsenol - density regulation mechanisms in bark beetle *Ips typographus*. *Journal of Chemical Ecology* 15(8):2263-2277.
- Schlyter, F., Byers, J.A., Lofqvist, J. 1987a. Attraction to pheromone sources of different quantity, quality, and spacing - density-regulation mechanisms in bark beetle *Ips typographus*. *Journal of Chemical Ecology* 13(6):1503-1523.
- Schlyter, F., Cederholm, I. 1981. Separation of the sexes of living Spruce bark beetles, *Ips typographus* (L), (Coleoptera, Scolytidae). *Journal of Applied Entomology* 92(1):42-47.
- Schlyter, F., Löfqvist, J., A., B.J. 1987b. Behavioural sequence in the attraction of the bark beetle *Ips typographus* to pheromone sources. *Physiological Entomology* 12(2):185-196.

- Schopf, A. 1985. Effect of photoperiod on development and cold hardiness of *Ips typographus* L. (Col, Scolytidae). *Anzeiger Für Schädlingkunde Pflanzenschutz Umweltschutz* 58(4):73-75.
- Schopf, A. 1989. The effect of photoperiod on the induction of the imaginal diapause of *Ips typographus* (L) (Col, Scolytidae). *Journal of Applied Entomology* 107(3):275-288.
- Schopf, R., Köhler, U. 1995. Untersuchungen zur Populationsdynamik der Fichtenborkenkäfer im Nationalpark Bayerischer Wald. 25 Jahre auf dem Weg zum Naturwald Neuschönau: Nationalparkverwaltung Bayerischer Wald
- Schroeder, L.M. 2010. Colonization of storm gaps by the spruce bark beetle: influence of gap and landscape characteristics. *Agricultural and Forest Entomology* 12(1):29-39.
- Schröter, H., Becker, T., Schelshorn, H. 1998. Die Bedeutung der Sturmwurfflächen als Borkenkäferquellen für umliegende Wirtschaftswälder. Fischer, A., editor. Landsberg Ecomed.
- Steinbrecher, R., Steigner, D., Homburg, F., Sörgel, C., Maurer, K. 2005. Entwicklung eines mobilen Sensors zur punktgenauen Früherkennung von Borkenkäferbefall durch *Ips typographus* (L.). Garmisch-Partenkirchen: Forschungszentrum Karlsruhe GmbH Institut für Meteorologie und Klimaforschung Atmosphärische Umweltforschung (IMK-IFU).
- Tillman, J.A., Seybold, S.J., Jurenka, R.A., Blomquist, G.J. 1999. Insect pheromones - an overview of biosynthesis and endocrine regulation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29(6):481-514.
- Tittiger, C., Blomquist, G.J., Ivarsson, P., Borgeson, C.E., Seybold, S.J. 1999. Juvenile hormone regulation of HMG-R gene expression in the bark beetle *Ips paraconfusus* (Coleoptera : Scolytidae): implications for male aggregation pheromone biosynthesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55(1):121-127.
- Tokro, P.G., Brossut, R., Sreng, L. 1993. Analysis of a sex pheromone from the female *Blatella germanica* L. *Insect Science and Its Application* 14(1):115-126.
- Vanderwel, D. 1994. Factors affecting pheromone production in beetles. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 25(4):347-362.
- Vité, J.P., Bakke, A., Renwick, J.a.A. 1972. Pheromones in *Ips* (Coleoptera: Scolytidae): Occurrence and production. *Canadian Entomologist* 104:1967-1975.
- Vité, J.P., Francke, W. 1976. The aggregation pheromones of bark beetles progress and problems. *Naturwissenschaften* 63(12):550-555.

- Wermelinger, B. 2004. Ecology and management of the spruce bark beetle *Ips typographus* - a review of recent research. *Forest Ecology and Management* 202(1-3):67-82.
- Wermelinger, B., Seifert, M. 1998. Analysis of the temperature dependent development of the spruce bark beetle *Ips typographus* (L) (Col, Scolytidae). *Journal of Applied Entomology* 122(4):185-191.
- Weslien, J. 1992. Monitoring *Ips typographus* (L.) populations and forecasting damage. *Journal of Applied Entomology* 114(4):338-340.
- White, R.A., Agosin, M., Franklin, R.T., Webb, J.W. 1980. Bark beetle pheromones - evidence for physiological synthesis mechanisms and their ecological implications. *Journal of Applied Entomology* 90(3):255-274.
- White, R.A., Franklin, R.T., Agosin, M. 1979. Conversion of α -pinene to α -pinene oxide by rat-liver and the bark beetle *Dendroctonus terebrans* microsomal fractions. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 10(3):233-242.
- Wichmann, L., Ravn, H.P. 2001. The spread of *Ips typographus* (L.) (Coleoptera, Scolytidae) attacks following heavy windthrow in Denmark, analysed using GIS. *Forest Ecology and Management* 148(1-3):31-39.
- Wood, D.L. 1982. The role of pheromones, kairomones, and allomones in the host selection and colonization behavior of bark beetles. *Annual Review of Entomology* 27:411-446.
- Wood, D.L., Browne, L.E., Silverst, R.M., Rodin, J.O. 1966. Sex pheromones of bark beetles- I. Mass production bio-assay source and isolation of sex pheromone of *Ips confusus* (Le C.). *Journal of Insect Physiology* 12(5):523-536.

9 Anhang:

9.1 Anhang zur Genetische Untersuchung zur Variabilität emittierter cis-Verbenolmengen

9.1.1 Homogenisierungspuffer

TRIS 1,2g/l
 EDTA 0,37g/l
 pH mit konz. HCL auf 6,8 einstellen

9.1.2 Trennsystem, Enzymsystem und Trennbedingungen

Trennsystem	Enzymsystem	Trennbedingungen
LIOH (Lithium-Citrat-Borat pH 8,3)	AAT; HK	250V; 70mA; 4h
TÄE 7,4 (Tris-Äpfelsäure pH 7,4)	MDH	180V; 160mA; 4h
TBE (Tris-Borat-EDTA pH 8,0)	EST; PGM	250V; 70mA; 4h
TC 7,0 (Tris-Citrat pH 7,0)	GPI; IDH; FBP	250V; 200mA; 4h

9.1.3 System, Elektrodenpuffer und Gelpuffer

Trennsystem	Elektrodenpuffer (EP)	Gelpuffer (GP)
LIOH (Lithium-Citrat-Borat pH 8,3)	Borsäure	11,0 g/l Tris 6,06 g/l
	LiOH * H2O	1,26 g/l Zitronensäure*H2O 1,68 g/l EP + GP => 1+9
TÄE 7,4 (Tris-Äpfelsäure pH 7,4)	Tris	12,1 g/l EP + H2O => 1+19
	Äpfelsäure	13,4 g/l
	EDTA 2Na	3,36 g/l
	MgCl * 6 H2O	2,03 g/l
	NaOH	ad pH 7,4
TBE (Tris-Borat-EDTA pH 8,0)	Tris	60,6 g/l EP + H2O => 1+9
	EDTA 2Na	6,7 g/l
	Borsäure	40,2 g/l
TC 7,0	Tris	17,0 g/l EP + H2O => 1+2,5

Anhang:

(Tris-Citrat pH 7,0)	Zitronensäure*H ₂ O	9,5 g/l
----------------------	--------------------------------	---------

9.1.4 System und Gelrezepte

Trennsystem	Gel				
	EP	GP	H ₂ O	Harnstoff	Stärke
LIOH (Lithium-Citrat-Borat pH 8,3)	22 ml	198 ml			22,0 g
TÄE 7,4 (Tris-Äpfelsäure pH 7,4)	11 ml		209 ml		22,0 g
TBE (Tris-Borat-EDTA pH 8,0)	22 ml		198 ml		22,0 g
TC 7,0 (Tris-Citrat pH 7,0)	63 ml		157 ml	1,6 g	22,0 g

9.1.5 Puffer zur Färbung

Pufferbezeichnung	Pufferkomponenten	Mengen	Kommentar
0,1M Phosphatpuffer pH 6,5	NA ₂ HPO ₄ *12 H ₂ O	28,7g/500ml	erste Lösung vorlegen und 2.
	NA ₂ HPO ₄ *H ₂ O	13,44g/700ml	Lösung dazugeben bis pH 6,5
0,2M Tris-HCL pH 7,0	Tris	24,2g/l	HCL ad pH 7,0
	EDTA	0,4g/l	
0,2M Tris-HCL pH 8,0	Tris	24,2g/l	HCL ad pH 8,0
	EDTA	0,4g/l	

9.1.6 Färberezepte

AAT	EC	Dimer
0.2M Tris-HCl pH 8.0		50 ml
L-Asparaginsäure		200 mg
Ketoglutarsäure		100 mg
Pyridoxal-5-phosphat		10 mg
Fast Blue BB, nach 30 Minuten Inkubation	in Puffer	50 mg
EST		Monomer
0.1M Phosphatpuffer pH 6,5		50 ml

Anhang:

1-Naphtylacetat	in Aceton	12 mg
Fast Garnet GBC-Salz		24 mg
FBP	EC 3.1.3.11	Di-/Tetramer
0.2M Tris-HCl pH 8.0		50 ml
MgCl ₂	0,5%	3 ml
D-Fructose-1,6-diphosphat		20 mg
NADP		20 mg
2-Mercaptoethanol	1Tr/10ml H ₂ O	1 Tr
Glucose-6-phosphat-Isomerase		50 units
G-6-PDH		40 units
NBT	1%	0.5 ml
PMS	1%	0.5 ml
GPI	EC 5.3.1.9	Dimer
0.2M Tris-HCl pH 7.0		50 ml
MgCl	0.5%	1 ml
D-Fructose-6-phosphat		40 mg
NAD	1%	2 ml
G-6-PDH		40 units
NBT	1%	0.5 ml
PMS	1%	0.5 ml
HK	EC 2.7.1.1	Monomer
0.2M Tris-HCl pH 8.0		50 ml
α-D-Glucose		500 mg
ATP		80 mg
MgCl	0,5%	1 ml
NAD	1%	1 ml
MTT	1%	0.5 ml
PMS	1%	0.5 ml
IDH	EC 1.1.1.42	Dimer
0.2M Tris-HCl pH 8.0		50 ml
MgCl ₂	0,5%	1 ml
DL-Isocitronensäure		75 mg
NADP		10 mg
NBT	1%	0.5 ml
PMS	1%	0.5 ml
MDH	EC 1.1.1.37	Dimer
0.2M Tris-HCl pH 8.0		50 ml
DL-Äpfelsäure*	2,0M	5 ml

Anhang:

NAD	1%	3 ml
NBT	1%	0.5 ml
PMS	1%	0.5 ml

*nicht auf TÄE-Gel

PGM	EC 5.4.2.2	Monomer
0.2M Tris-HCl pH 8.0		50 ml
MgCl	0,5%	1 ml
α -D-Glucose-1-phosphat		100 mg
NAD	1%	1 ml
G-6-PDH		40 units
NBT	1%	0.5 ml
PMS	1%	0.5 ml

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Promotionsprüfung vorgelegten Arbeit mit dem Titel:

Emission von Kommunikationsstoffen des Buchdruckers:

Effekt auf Artgenossen und zeitlicher Verlauf

am Lehrstuhl für Tierökologie unter der Anleitung und Betreuung durch Professor Dr. Reinhard Schopf ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegende Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

München, den

Lars Lehmborg

Lebenslauf

Lars Lehmborg
geboren am 09.04.1980 in Seeheim-Jugenheim
Familienstand verheiratet
lehmborg@wzw.tum.de

AUSBILDUNG

Hochschule

seit 06/2008

**Promotion an der Fakultät Wissenschaftszentrum
Weißenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt
der Technischen Universität München am Lehrstuhl für
Tierökologie**

12/2006

Abschluss des Studiums der Biologie

10/2000-12/2006

**Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-
Maximilians-Universität Würzburg**

Studienschwerpunkte:

- Tierökologie und Tropenbiologie
- Verhaltensphysiologie und Soziobiologie
- Ökophysiologie der Pflanzen und Vegetationsökologie

Schule

08/1996-06/1999

**Schuldorf Bergstrasse in Seeheim-Jugenheim
(Oberstufe)**

08/1990-7/1996

**Melibokusschule in Alsbach-Hähnlein
(Mittelstufe)**

08/1986-7/1990

**Hähnleiner Schule in Alsbach-Hähnlein
(Grundschule)**

KONFERENZEN

03/2011

Lehmborg L., Gruppe A. & Schopf R. (2011)
Is tracheally released pheromone involved in *Ips typographus*
aggregation?
Entomologentagung der DGaE 2011, Berlin, p. 153

08/2010

Lehmborg L., Schaller S., Gruppe A. & Schopf R. (2010)
A new release mechanism of cis-verbenol, a constituent of the
aggregation pheromone of the European spruce bark beetle *Ips*
typographus
IXth European Congress of Entomology, Budapest, p. 104
