

derung des Faktors 2,5 bei Dichteschätzungen im Frühsommer scheint die Ursache dafür zu sein, daß landwirtschaftliche Betriebe zu diesem Zeitpunkt noch keine Populationseinschränkungen einleiteten, obwohl diese bereits notwendig gewesen wären, da sie die wirklich existierende Individuendichte unterschätzten. Weitere Untersuchungen zu dieser Problematik erscheinen daher unumgänglich.

Literatur

ANSORGE, H., 1983: Zur Wertung der Quadratmethode beim Kleinsäugerfang. Säugetierkd. Inf. 2 (7), 13–18.
 BEACHAM, T. D. and C. J. KREBS, 1980: Pitfall versus livetraps enumeration of fluctuating populations of *Microtus townsendii*. J. Mamm. 61, 486–499.
 BLUMENBERG, D., 1986: Telemetrische und endoskopische Untersuchungen zur Soziologie, zur Aktivität und zum Massenwechsel der Feldmaus, *Microtus arvalis* (PALL.). Z. Angew. Zool. 73, 301–344.
 BRÖNNER, G. and J. MEESTER, 1987: Comparison of methods for estimating rodent numbers. S. Afr. J. Wildl. Res. 17, 59–63.
 GRUNWALD, H., 1975: Changes in trappability of common vole. Acta theriol. 20, 333–341.
 HEISE, S. and M. STUBBE, 1987: Populationsökologische Untersuchungen zum Massenwechsel der Feldmaus, *Microtus arvalis* (PALLAS, 1779). Säugetierkd. Inf. 2 (11), 403–414.

HEISE, S., J. LIPPKE und H. WIELAND, 1991: Beiträge zur Populationsregulation der Feldmaus (*Microtus arvalis*, PALLAS, 1779) I. Reproduktionspotential. Zool. Jb. Abt. Syst. Ökol. d. Tiere 118 (2), im Druck.

LIRO, A., 1974: Renewal of burrows by the common vole as the indicator of its numbers. Acta theriol. 19, 259–272.

McSHEA, W. J., 1989: Reproductive synchrony and home range size in a territorial microtine. OIKOS 56, 182–186.

NABAGLO, L., K. A. ADAMCZEWSKA-ANDRZEJEWSKA and R. MACKIN-ROGALSKA, 1984: Trappability and the distribution of individual captures in a common vole population. Acta theriol. 29, 159–166.

PELIKAN, J., J. ZEJDA and V. HOLISOVA, 1977: Efficiency of different traps in catching small mammals. Folia Zool. 26, 1–13.

REICHSTEIN, H., 1960: Untersuchungen zum Aktionsraum und zum Revierverhalten der Feldmaus (*Microtus arvalis*, PALL.). Z. Säugetierkd. 25, 150–169.

STEIN, G. H. W., 1957: Über ein neues Verfahren zur Bestimmung der Bestandsdichte bei Feldmäusen, *Microtus arvalis*. Nachr.blatt Deutsch. Pflanzenschutzd. 11, 149–154.

SYKORA, W., 1978: Methodische Hinweise zur Kleinsäugetierforschung. Abh. Ber. Naturk. Mus. Mauritium Altenburg 10, 1–33.

WIELAND, H., 1973: Beiträge zur Biologie und zum Massenwechsel der Großen Wühlmaus (*Arvicola terrestris* L.). Zool. Jb. Abt. Syst. Ökol. d. Tiere 100, 351–428.

WIELAND, H. and G. SCHELLENBERG, 1984: Empfehlungen zur Überwachung und Bekämpfung der Feldmaus (*Microtus arvalis* PALL.) in Feldkulturen. Nachr.blatt Pflanzenschutz DDR 12, 254–256.

Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., 41 (2), S. 33–35, 1991, ISSN 0027-7479.

© Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Pflanzenschutz im Obstbau, Dossenheim

Untersuchungen zur Letalfärbung entomophager Nematoden der Gattung *Steinernema* (Nematoda: Steinernematidae)

Investigations for staining dead entomophagous nematodes of the genus *Steinernema* (Nematoda: Steinernematidae)

Von Gerlinde Nachtigall

Zusammenfassung

Die Erkennung äußerlich intakter, jedoch letal geschädigter infektiöser Dauerlarven (= L3) entomophager Nematoden erforderte bisher einen hohen Zeitaufwand. Ein neues Färbefahren wird vorgestellt, das eine schnelle Differenzierung von vitalen L3 ermöglicht. Durch eine dauerhafte Anfärbung des Körpers mit Toluidin- und Methylenblau (1%) konnten durch Lagerung oder Eintrocknung letal geschädigte L3 von *Steinernema bibionis* (OBS-III) und *S. feltiae* (DD-136) (Steinernematidae) schnell und sicher von lebenden, ungefärbten Tieren unterschieden werden. Die Vitalität der lebenden Dauerlarven wurde durch den Farbstoff nicht beeinträchtigt. Eine Verlängerung der Färbezeit bis 4 Tage veränderte die Zahl der ungefärbten (= lebenden) Dauerlarven ebenfalls nicht. Vorversuche mit Nematoden der Gattung *Heterorhabditis* zeigten ebenfalls eine selektive Anfärbung der toten Dauerlarven.

Abstract

Up to now intact looking but lethally damaged infectious dauerlarvae (= L3) of entomophagous nematodes could only be recognized by a

time-consuming method. A new staining method is presented enabling a fast distinction between dead and vital L3. Due to the permanent staining with toluidine blue (1%) or methylene blue (1%) an immediate distinction of lethally damaged L3 (caused by storing or desiccation) of *Steinernema bibionis* (OBS-III) and *S. feltiae* (DD-136) (Steinernematidae) could be achieved. Living nematodes remained uncoloured. Also, the pigments did not affect the vitality of the living dauerlarvae. Even a prolonged staining time up to 4 days did not change the number of stained, i.e. dead dauerlarvae. Pilot tests with nematodes of the genera *Heterorhabditis* also showed a selective staining of dead dauerlarvae.

Der Einsatz von entomophagen Nematoden gewinnt im biologischen und integrierten Pflanzenschutz zunehmend an Bedeutung. Die Produktion und Vermarktung von Nematoden erfordert regelmäßige Qualitätskontrollen, um u. a. eine gleichmäßig hohe Vitalität der infektiösen Dauerlarven (L3) zu gewährleisten.

Bewegungslosigkeit der L3 zum Zeitpunkt der Kontrolle stellt kein Kriterium für den Tod der Dauerlarven dar. Werden ausgestreckte, scheinbar tote Tiere mit einer Nadel mehrmals gereizt, schlängeln sich lebende L3 wieder oder zeigen zumindest eine kurze, starke Zuckung des ganzen Körpers.

Diese Methode ist für die Auswertung vieler Proben zu zeitaufwendig. Darüber hinaus ist die Bestimmung des Anteils toter bzw. lebender L3 bei vielen Fragestellungen im Labor von großem Interesse.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, durch selektive Anfärbung toter oder lebender Nematoden eine deutliche und daher rasche Unterscheidung zu ermöglichen. Voraussetzung ist, daß die Farbstoffe die Vitalität der lebenden Tiere nicht beeinflussen. Die Färbung sollte ohne erheblichen Arbeitsaufwand durchgeführt werden können. Färbemethoden zur Lebend-Tot-Differenzierung sind hauptsächlich für pflanzenpathogene Nematoden bekannt (SHEPHERD, 1962; OGIGA und ESTEY, 1974; BIRD, 1979).

Eine entsprechende Methode für entomophage Nematoden wurde bisher nicht beschrieben. Sie wird erschwert durch die Tatsache, daß Mund und Anus des Dauerlarvenstadiums entomophager Nematoden verschlossen sind. Außerdem wird ein Teil der L3 noch von der Kutikula des vorhergehenden L2-Stadiums umhüllt, die spätestens während der Penetration des Wirtsinsekts abgestreift wird (POINAR, 1979). Der Farbstoff muß daher in der Lage sein, selektiv die Dauerlarven anzu färben.

Material und Methoden

Folgende Farbstoffe wurden an Dauerlarven von *Steinernema feltiae* FILIPJEV, 1934 und *Steinernema bibionis* BOVIEN, 1937 (WOUTS et al., 1982) getestet:

- Toluidinblau O (0,5%) und in 0,15molarer Essigsäure gesättigtes Eosin
- Toluidinblau O/Borax, 0,5%
- Toluidinblau O/Borax, 1%
- Toluidinblau O, 0,5%
- Toluidinblau O, 1%
- Evans Blue, 1%
- Methylenblau B extra, 0,5%
- Methylenblau B extra, 1%

In Vorversuchen waren lediglich Toluidinblau (1%) und Methylenblau (1%) in der Lage, tote L3 dauerhaft zu färben. Toluidinblau (TB) färbte die Tiere tiefblau, Methylenblau (MB) violettblau. Die Intensität der Färbung variierte. In weiteren Versuchen wurden diese beiden Farbstoffe an Dauerlarven von *S. feltiae* (DD-136) und *S. bibionis* (OBS-III) ausführlich getestet.

1. Vorbehandlung der Nematoden

Vor der Färbung wurden die Dauerlarven (vermehrt auf Wachsmottenlarven [*Galleria mellonella*, Pyralidae]) wie folgt behandelt:

A.: In Glaspetrischalen lagerten die Dauerlarven in Pufferlösung bei 6–8°C (Mortalität eines bestimmten Anteils durch Sauerstoffmangel und/oder andere unbekannte Ursachen).

B.: In geschlossenen Einweckgläsern (1000 ml) konnten nach der Methode von WINSTON und BATES (1961) mit definierten gesättigten Salzlösungen 6 verschiedene relative Luftfeuchten (0–91% r.F., 20°C) hergestellt werden. In ein Drahtgestell (am Deckel befestigt), das bis zur Mitte des Glases reichte, wurden Objektträger eingesetzt, auf denen je 15 µl Nematodensuspension verstrichen waren. Durch die Inkubation bei niedrigen rel. Luftfeuchten „trockneten“ die Dauerlarven rasch ein und töteten einen unbekanntem Anteil der Tiere ab. Unmittelbar danach wurden die L3 in Phosphatpufferlösung resuspendiert und anschließend gefärbt.

C.: Schnelle, 100%ige Abtötung der L3 durch Erhitzen der Nematodensuspension auf 70–80°C.

D.: Mechanische Verletzung bzw. Durchtrennung lebender Dauerlarven und sofortiges Einbringen in 1%ige TB-Lösung für 1–5 Minuten.

2. Färbung

Die Nematoden wurden auf einem Filter (Porengröße 15 µm) eingeeengt (Filtration im Wasserstrahlvakuum) und in einigen Millilitern Pufferlösung suspendiert. Die konzentrierte Suspension wurde geschüttelt, 0,5 bzw. 1,0 ml in eine Petrischale (3,5 cm Ø) pipettiert, das gleiche Volumen der frisch angesetzten Farblösung hinzugefügt, beides vermischt und die Petrischale verschlossen. Färbezeiten von 1 Stunde bis ca. 4 Tagen wurden bei Raumtemperatur (ca. 20°C) getestet. Danach wurde die Färbelösung durch Pufferlösung ersetzt und gefärbte wie ungefärbte Tiere ausgezählt.

3. Bestimmung des Anteils gefärbter bzw. ungefärbter Dauerlarven

In Abhängigkeit von der Nematodenzkonzentration wurden 0,2 bis 0,5 ml der verdünnten Nematodensuspension in mehreren Tropfen auf einen Objektträger pipettiert. Im Stereomikroskop mit Durchlichtstativ (Wild M3Z) konnten im Hell- oder Dunkelfeld gefärbte wie ungefärbte L3 gut unterschieden werden.

Pro Probe wurden mindestens 100 Tiere gezählt. Bei einer 17stündigen Färbezeit wurde jede Variante fünfmal wiederholt. Um sicherzustellen, daß die Zahl gefärbter der Zahl unbeweglicher, toter Dauerlarven entsprach, wurden gefärbte wie ungefärbte, *inaktive* Dauerlarven in Stichproben einzeln 4–5× gereizt. Lebende Dauerlarven zeigten dann ein kurzes Zusammensucken des Körpers oder begannen sich zu bewegen. Auch nach dieser Behandlung noch unbewegliche Dauerlarven galten als tot.

Um die Validität der Färbemethoden gegenüber der üblichen Methode der Einzelreizung abzusichern, wurde zum Vergleich der Nadelreiztest bei in Phosphatpuffer gelagerten, ungefärbten Tieren durchgeführt.

Lediglich die Daten der 17stündigen Färbung konnten aufgrund der großen Anzahl ausgewerteter Tiere (n-Wert), varianzanalytisch verrechnet werden (ANOVA, TUKEY, $\alpha = 0,05$).

Ergebnisse und Diskussion

Die nach den Vorversuchen nicht weiter getesteten Farbstoffe zeigten an Dauerlarven der Gattung *Steinernema* folgende Effekte:

Nach einer 4stündigen Färbung mit Toluidinblau 0,5% + gesättigter Eosinlösung waren lediglich einige tote Tiere oder leere L2-Hüllen rot angefärbt.

Toluidinblau/Borax (0,5 und 1%) färbte nach 3 Stunden die L2-Kutikula der Dauerlarven rosarot. Diese Färbung verschwand bereits nach kurzer Zeit. Tote Tiere wurden nicht angefärbt.

Evans Blue (1%) zeigte nach einer Färbezeit bis zu 3 Tagen eine Anfärbung der L2-Kutikula sämtlicher toter wie lebender Dauerlarven. Diese Blaufärbung war ebenfalls reversibel und nach kurzer Zeit nicht mehr sichtbar.

Demgegenüber färbten TB und MB den gesamten Körper der Dauerlarven meist intensiv an. Die Kutikula der L3 blieben immer ungefärbt. Eventuell an L2- oder L3-Kutikula anhaftende Farbpigmente lösten sich kurze Zeit nach der Farbeinwirkung wieder ab. In Tabelle 1 sind die Resultate der 17stündigen Färbezeit mit TB und MB dargestellt. Innerhalb jeder Nematodenart ergaben sich keine signifikanten Unter-

Tab. 1. Vergleich der Färbung von Toluidinblau und Methyleneblau an Dauerlarven von *Steinernema* sp., Vorbehandlung: Lagerung in Pufferlösung (pH 7,1) bei 6–8 °C, Färbezeit: 17 Stunden bei Raumtemperatur (20 °C)

Färbung	<i>Steinernema bibionis</i>		<i>Steinernema feltiae</i>	
	Σn	ungefärbte Tiere in %*	Σn	ungefärbte Tiere in %*
Toluidinblau, 1 %	815	39,3a	879	26,0b
Toluidinblau, 0,5 %	635	41,0a	1112	24,5b
Methyleneblau, 1 %	681	42,0a	968	23,2b
Methyleneblau, 0,5 %	745	43,9a	767	24,2b
Nadelreiztest	689	45,0a (= leb. Nematoden)	925	22,1b (= leb. Nematoden)

* Kennzeichnung der Werte in einer Spalte mit verschiedenen Buchstaben ergibt einen signifikanten Unterschied für $\alpha = 0,05$.

schiede zwischen den einzelnen Farbbehandlungen und der Nadelreizung für $\alpha = 0,05$. Beide Farbstoffe eigneten sich sehr gut für die Anfärbung durch Lagerung letal geschädigter Dauerlarven von *S. bibionis* und *S. feltiae*. Sie gehören zur Gruppe der kationischen Phenothiazin-Farbstoffe, von denen sich z. B. MB bereits zur Letalfärbung des freilebenden Nematoden *Rhabditis oxycerca* DE MAN, 1895 bewährt hat (GÜNTHER, 1990).

Lebende, ungefärbte L3 konnten im Dunkelfeld schnell und problemlos ausgezählt werden, da sich die angestrahlten, weiß erscheinenden Dauerlarven deutlich von dem dunklen Untergrund abhoben. TB färbte die toten L3 tiefblau an. Sie erschienen im Dunkelfeld leuchtend tiefblau und waren ebenfalls problemlos sichtbar. Für die Erkennung der durch MB eher violett angefärbten Tiere war die Hellfeldeinstellung in manchen Fällen besser geeignet.

In stichprobenartigen Auswertungen entsprach die Zahl gefärbter der Zahl toter Dauerlarven (Nadelreiztest). Eine Färbung lebender Nematoden konnte nicht beobachtet werden. Selbst die Beweglichkeit der lebenden Tiere wurde durch die Färbelösung nicht beeinträchtigt, obwohl diese mit einem pH von 3,1 (TB) und 4,5 (MB) im sauren Bereich liegen. Im Unterschied dazu fand GÜNTHER (1990) für *R. oxycerca*, daß eine 24stündige Einwirkung einer 1%igen Methyleneblaulösung über 60 % der Nematoden abtötete.

Eine Auswertung der Dauerlarven konnte noch mehrere Tage nach Beendigung der Färbezeit vorgenommen werden. Der Anteil ungefärbter (= lebender) Nematoden unterschied sich auch 14 Tage nach der Anfärbung nicht (Lagerung bei 6–8 °C). Eine Entfärbung der Tiere trat nicht ein.

Auch die Reduktion der Färbezeit auf 5 Stunden veränderte die Zahl gefärbter Nematoden und die Intensität der Färbung nicht. Wirkte die Farblösung 1, 2 oder 4 Stunden auf die Dauerlarven, wurden im Vergleich zum Nadelreiztest bis zu 10 % weniger Nematoden angefärbt. Auch die Farbintensität war oft schwächer. Die Färbezeit sollte daher mindestens 5 Stunden betragen.

Erste Versuche mit Nematoden der Gattung *Heterorhabditis* (Isolate: IH 127, HW 79) bestätigten die mit *Steinernema*

erhaltenen Resultate. Aufgrund ihrer vergleichbaren Morphologie und Lebensweise (beide Gattungen gehören zu den Entomoparasiten mit einem im Boden freilebenden, Mund und Anus verschlossenen Dauerlarvenstadium) kann eine ähnliche Affinität zu den getesteten Farbstoffen vermutet werden.

Ein entscheidender Vorteil der beiden Farbstoffe ist, daß bei allen durchgeführten Versuchen kein letaler Effekt auf die Dauerlarven beobachtet werden konnte. Das zeigte sich auch daran, daß nach einer Färbezeit von bis zu 4 Tagen kein Ansteigen der Zahl gefärbter Dauerlarven festzustellen war.

Auch durch niedrige Luftfeuchten eingetrocknete und letal geschädigte L3 ließen sich in gleichem Maße anfärben. Eine Verlängerung der Färbezeit auf 1–3 Tage färbte die toten L3 tiefblau an. Kürzere Inkubationszeiten zeigten teilweise variierte Resultate. Lediglich in einem Fall wurde eine lebende L3 angefärbt, was ursächlich auf eine Verletzung hindeuten kann. Einminütige Färbungen von mechanisch verletzten L3 zeigten, daß die Farbstofflösung an den Verletzungsstellen unmittelbar eindringt und das Gewebe anfärbt.

Eine einheitliche intensive Anfärbung der durch Erhitzen auf 70–80 °C getöteten L3 wurde nach 4–5 Stunden erreicht.

Eine bevorzugte Eintrittsstelle für die Farbstofflösung konnte nicht beobachtet werden. Bei Entnahme von Proben nach Färbezeiten von weniger als einer Stunde zeigten die Dauerlarven entweder eine

- Anfärbung des gesamten Körpers (leicht bis intensiv) oder
- eine Färbung im Mund- und Oesophagusbereich oder
- eine Färbung im Schwanz- und Anusbereich oder
- eine Färbung der Ventralseite der Körpermitte.

Die Untersuchungen ermöglichten eine sichere und schnelle Differenzierung toter/lebender L3 gelagerter oder „getrockneter“ Dauerlarven der Gattung *Steinernema* durch die Anfärbung toter L3 mit TB oder MB. Da die Ursache der Mortalität einen wesentlichen Einfluß auf das Anfärbeverhalten von Nematoden ausüben kann, sind die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung nicht ohne eine vorherige Überprüfung auf bislang nicht getestete Mortalitätsfaktoren (verschiedene Chemikalien, Pflanzenschutzmittel u. a.) übertragbar.

Literatur

- BIRD, A. F., 1979: A method of distinguishing between living and dead nematodes by enzymatically induced fluorescence. *J. Nematology* **11**, 103–105.
- GÜNTHER, B., 1990: Untersuchungen zum Letalnachweis wirkstoffbehandelter Nematoden. *Arch. Phytopathol. Pflanzenschutz* **26**(2), 145–151.
- OGIGA, I. R. and R. H. ESTEY, 1974: The use of Meldola blue and Nile blue A, for distinguishing dead from living nematodes. *Nematologica* **20**, 271–276.
- POINAR, jr., G. O., 1979: Nematodes for biological control of insects. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- SHEPHERD, A. M., 1962: New blue R, a stain that differentiates between living and dead nematodes. *Nematologica* **8**, 201–208.
- WOULS, W. M., Z. MRÁČEK, S. GERDIN and R. A. BEDDING, 1982: *Neoplectana Steiner*, 1929 a junior synonym of *Steinernema* Travassos, 1927 (Nematoda: Rhabditida). *Syst. Parasitology* **4**, 147–154.
- WINSTON, P. W. and D. H. BATES, 1960: Saturated solutions for the control of humidity in biological research. *Ecology* **41**, 232–237.