

Abschlussbericht Teilprojekt 1

Einfluss von Insekten- giften auf die Partner- und Wirts- findung

Projektverbund BayÖkotox

Ökotoxikologische Bewertung von Stoffen in der Umwelt

Nils Schöfer

Prof. Dr. Joachim Ruther

Universität Regensburg
Institut für Zoologie, Professur für
Chemische Ökologie
Universitätsstraße 31
93053 Regensburg
Tel.: +49 941 9432151
Fax: +49 941 9435583
E-Mail: joachim.ruther@ur.de
Web: [https://www.uni-regens-
burg.de/biologie-vorklinische-medi-
zin/chemische-oekologie/home/in-
dex.html](https://www.uni-regensburg.de/biologie-vorklinische-medi-zin/chemische-oekologie/home/index.html)

Berichtszeitraum:

1. Februar 2020 bis 15. Juni 2023

Finanziert durch

Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Verbraucherschutz
Rosenkavalierplatz 2
81925 München



finanziert durch
Bayerisches Staatsministerium für
Umwelt und Verbraucherschutz



Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis	3
1 Kurzzusammenfassung	3
2 Einleitung	4
3 Aufgabenstellung	5
4 Vorgehensweise und Ergebnisse	6
4.1 Versuche mit dem Modellsystem <i>Nasonia vitripennis</i>	6
4.1.1 Verabreichung der Wirkstoffe.....	6
4.1.2 Effekte auf die Pheromonkommunikation.....	7
4.1.3 Effekte auf die Paarungshäufigkeit.....	8
4.1.4 Effekte auf die Wirtsfindung.....	9
4.1.5 Effekte auf die Fertilität.....	11
4.2 Versuche mit dem Modellsystem <i>Lariophagus distinguendus</i>	11
4.2.1 Verabreichung der Wirkstoffe.....	12
4.2.2 Effekte auf die Pheromonkommunikation.....	12
4.2.3 Effekte auf die Paarungshäufigkeit.....	14
4.2.4 Effekte auf die Wirtsfindung.....	15
4.2.5 Effekte auf die Fertilität.....	15
4.3 Versuche mit dem Modellsystem <i>Leptopilina heterotoma</i>	16
4.3.1 Verabreichung der Wirkstoffe.....	17
4.3.2 Effekte auf die Pheromonkommunikation.....	18
4.3.3 Effekte auf die Paarungshäufigkeit.....	22
4.3.4 Effekte auf die Wirtsfindung.....	22
4.3.5 Transfer der Wirkstoffe über die Nahrungskette.....	23
5 Diskussion	24
6 Zusammenfassung	29
7 Ausblick	29
8 Veröffentlichungen	31
Literaturverzeichnis	31
Abbildungsverzeichnis	36

Abkürzungsverzeichnis

LC ₅₀	letale Konzentration für 50% der behandelten Tiere
LD ₅₀ :	letale Dosis für 50% der behandelten Tiere
LOEL:	Lowest Observed Effect Level
mg:	Milligramm
µg:	Mikrogramm
MQ:	4-Methylchinazolin
ng:	Nanogramm
nl:	Nanoliter
pg:	Pikogramm
RR-HDL:	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-5-Hydroxy-4-decanolid
RS-HDL:	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-5-Hydroxy-4-decanolid
SD:	Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i>)

1 Kurzzusammenfassung

Insektizide werden weltweit in großem Maßstab im Pflanzenschutz eingesetzt und können auf verschiedenen Wegen auch in nützliche Nichtzielorganismen gelangen. Neben letalen Effekten können sie hier auch weniger offensichtliche, subletale Effekte haben. In Voruntersuchungen wurde gezeigt, dass subletale Dosen des neurotoxischen Neonicotinoids Imidacloprid die über Pheromone vermittelte Partnerfindung und die Wirtsfindung der parasitischen Wespe *Nasonia vitripennis* drastisch stören. In Teilprojekt 1 wurde an *N. vitripennis* und zwei weiteren Arten parasitischer Wespen (*Lariophagus distinguendus* und *Leptopilina heterotoma*) untersucht, ob auch das weiterhin zugelassene Neonicotinoid Acetamiprid sowie drei Vertreter anderer Wirkstoffklassen, die auf cholinerge Neuronen des Nervensystems von Insekten wirken (Dimethoat, Flupyradifuron und Sulfoxaflor), ähnliche Effekte haben. Hierzu wurde das pheromonvermittelte Paarungsverhalten und die Wirtsfindung behandelter Wespen und unbehandelter Kontrolltiere mittels computergestützter Biotestverfahren quantitativ analysiert. Es zeigte sich, dass subletale Dosen aller vier Wirkstoffe bei mindestens einer der getesteten Arten die pheromonvermittelte sexuelle Kommunikation und/oder die olfaktorische Wirtsfindung beeinträchtigten. Die Ergebnisse des Teilprojektes deuten somit darauf hin, dass subletale Dosen von Insektiziden, welche auf die cholinergen Neuronen von Insekten abzielen, den Geruchssinn und das Paarungsverhalten parasitischer Wespen stören. Es muss davon ausgegangen werden, dass dies deren wichtige Funktion als natürliche Gegenspieler in Ökosystemen negativ beeinflusst.

2 Einleitung

Die letalen und subletalen Effekte von Pestiziden auf Nichtzielorganismen werden als eine der Ursachen für den derzeit stattfindenden Rückgang von Insekten angesehen [1, 2]. Insbesondere die neurotoxischen Neonicotinoid-Insektizide sind hier in die Kritik geraten, jedoch konzentrierte sich die Forschung bislang hauptsächlich auf Bestäuber [3-6], obwohl auch andere nützliche Nichtzielorganismen wie parasitische Wespen (Parasitoide) betroffen sein können [7-10]. Parasitische Wespen entwickeln sich typischerweise auf oder in anderen Insekten und spielen als natürliche Gegenspieler eine enorm wichtige Rolle für das Funktionieren terrestrischer Ökosysteme [11]. Wie bei den meisten Insekten ist der chemische Sinn von zentraler Wichtigkeit für den Reproduktionserfolg parasitischer Wespen. Unsere Voruntersuchungen am Modellorganismus *Nasonia vitripennis* haben gezeigt, dass subletale Dosen des Neonicotinoids Imidacloprid die chemisch vermittelte Partner- und Wirtsfindung drastisch behindern [12]. Mit subletalen Dosen behandelte Weibchen reagierten nicht mehr auf das männliche Sexualpheromon und beide Geschlechter zeigten ein verändertes Verhalten während der Balz, sodass die Verpaarungsrate im Vergleich zu den Kontrollen um bis zu 80% zurückging. Zudem waren behandelte Weibchen weniger erfolgreich bei der olfaktorischen Wirtsfindung. Ähnliche Ergebnisse ergab eine kürzlich erschienene Studie zu der verwandten Art *Spalangia endius* [13]. Diese Befunde deuten darauf hin, dass der Geruchssinn der parasitischen Wespen durch subletale Dosen von Neonicotinoiden beeinträchtigt wird, sodass diese Wirkstoffgruppe deren Effektivität als natürliche Feinde auch in der Natur negativ beeinflussen dürfte. Für allgemeinere Rückschlüsse müssen jedoch weitere Arten und Verbindungen mit ähnlichem Wirkmechanismus untersucht werden.

Aufgrund der Vielzahl von Studien, die negative Effekte von Neonicotinoiden auf Nichtzielorganismen gezeigt haben, wurde der Freilandeinsatz von drei der am häufigsten eingesetzten Wirkstoffe Imidacloprid, Clothianidin und Thiamethoxam 2018 von der EU verboten¹. Jedoch sind andere Neonicotinoide wie Acetamiprid sowie Insektizide mit einem ähnlichen Wirkmechanismus weiterhin zugelassen. Neonicotinoide wirken als Agonisten auf nicotinerge Acetylcholinrezeptoren (nAChR) und lösen eine unkontrollierte Dauerreizung des Rezeptors aus [6]. Da die synaptische Übertragung in sensorischen Systemen einschließlich des Geruchssinns bei Insekten hauptsächlich cholinerg erfolgt [14], ist nicht auszuschließen, dass die bei *N. vitripennis* gefundenen subletalen Effekte von Neonicotinoiden bei Insekten generell auftreten. Zudem wirken auch andere Wirkstoffklassen, die Neonicotinoide in Zukunft ersetzen sollen [15], als Agonisten auf das cholinerge System (z.B. das Sulfoximin-Derivat Sulfoxaflor und das Butenolid-Derivat Flupyradifuron). Auch die seit langem als Insektizide eingesetzten Organophosphorsäureester (z.B. Dimethoat) wirken als Acetylcholinesterase-Inhibitoren auf das cholinerge System von Insekten. Somit sind ähnliche subletale Effekte auf den Geruchssinn von Insekten, wie sie bei den Neonicotinoiden gefunden wurden, auch bei diesen Wirkstoffklassen denkbar. Im Falle von Sulfoxaflor zeigte z.B. eine Studie an Hummeln, dass die Exposition von Kolonien gegenüber subletalen Dosen die Zahl der Nachkommen reduzierte [15]. Zudem wird das assoziative Lernvermögen von Bienen durch subletale Dosen von Sulfoxaflor und Flupyradifuron gestört [16, 17]. Eine Studie mit geringeren, feldrealistischen Dosen von

¹Presseinformation BLV (https://www.bvl.bund.de/DE/04_Pflanzenschutzmittel/06_Fachmeldungen/2018/2018_08_22_Fa_Widerruf_Neonicotinoide.html)

Sulfoxaflor stellte hingegen keine negativen Effekte auf das Lernvermögen von Honigbienen und Hummeln fest [18]. Auch für Dimethoat wurden in einer vergleichenden Studie keine negativen Effekte auf das olfaktorische Lernvermögen von Honigbienen festgestellt [19].

Weitgehend ungeklärt ist noch, auf welchem Weg parasitische Wespen mit subletalen Dosen der Wirkstoffe in Kontakt kommen können. Da viele Arten floralen und extrafloralen Nektar als Kohlenhydratquelle nutzen, ist wie bei Bestäubern eine Aufnahme auf diesem Weg möglich [8, 10]. Auch das aktiv von Pflanzen ausgeschiedene Guttationswasser, welches hohe Gehalte an Insektiziden enthalten kann [20-23], wird von parasitischen Wespen als Nährstoffquelle verwendet [24]. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass parasitische Wespen Neonicotinoide bereits durch bloßen Kontakt mit systemisch behandelten Pflanzen aufnehmen [9]. Aufgrund der besonderen Lebensweise parasitischer Wespen stellt sich jedoch insbesondere die Frage, ob die Wirkstoffe in biologisch aktiven Dosen auch über mit subletalen Dosen belastete Wirtsorganismen aufgenommen werden können und dann die beschriebenen Effekte auslösen.

3 Aufgabenstellung

Basierend auf den bislang vorliegenden Ergebnissen zum *Nasonia*-Modellsystem [12] und gut etablierten Biotestverfahren für zwei weitere Parasitoidenarten (*Lariophagus distinguendus* und *Leptopilina heterotoma*) sollen in dem Projekt die subletalen Effekte eines weiterhin (beschränkt) zugelassenen Neonicotinoids (Acetamiprid) sowie von Vertretern dreier ebenfalls auf das cholinerge System wirkender Wirkstoffgruppen (Sulfoximine: Sulfoxaflor, Butenolide: Flupyradifuron, Organophosphorsäureester: Dimethoat) (Abbildung 1) untersucht werden. Hierbei sollen insbesondere die Fragen beantwortet werden, ob subletale Dosen der vier Wirkstoffe die Pheromonkommunikation und das Paarungsverhalten, die olfaktorische Wirtsfindung und die Fertilität (Nachkommenzahl) der parasitischen Wespen negativ beeinflussen.

Zudem soll mit dem *Leptopilina*-Modellsystem an einem der Wirkstoffe (Dimethoat) untersucht werden, ob biologisch aktive, subletale Dosen über die Nahrungskette (Wirtsnahrung → Wirt → Parasitoid) von den parasitischen Wespen aufgenommen werden können und dann ähnliche Effekte wie in applizierter Form haben. Ursprünglich geplante Versuche mit einem weiteren Modellsystem (*Cotesia marginiventris*) ließen sich aufgrund der Corona-Pandemie nicht realisieren.

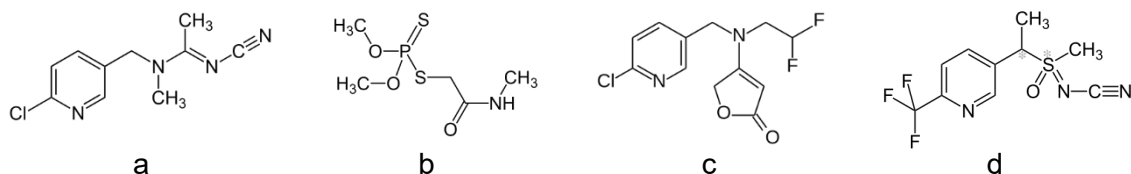


Abbildung 1: Strukturformeln der vier untersuchten Wirkstoffe. a) Acetamiprid, b) Dimethoat, c) Flupyradifuron, d) Sulfoxaflor

4 Vorgehensweise und Ergebnisse

4.1 Versuche mit dem Modellsystem *Nasonia vitripennis*

N. vitripennis ist in den vergangenen Jahrzehnten zu einem intensiv erforschten Modellorganismus geworden [25]. Die Wespen haben eine Größe von 1-2 mm und parasitieren die Puppen verschiedener Fliegenarten. Für die Experimente wurden die Wespen auf Puppen der Art *Lucilia caesar* gezüchtet. Männchen produzieren in ihrem Abdomen ein Sexualpheromon, welches attraktiv auf unverpaarte Weibchen wirkt. Das Pheromon besteht aus den drei Komponenten (4*R*,5*S*)-5-Hydroxy-4-decanolid (RS-HDL), (4*R*,5*R*)-5-Hydroxy-4-decanolid (RR-HDL) und 4-Methylchinazolin (MQ) [26, 27]. Nach der Paarung suchen die Weibchen nach geeigneten Wirten, um ihre Eier abzulegen. Diese Wirte finden sie durch olfaktorische Reize, welche die Wirte passiv abgeben (Steiner and Ruther, 2009).

4.1.1 Verabreichung der Wirkstoffe

Um den Bereich subletaler Dosen für die Wirkstoffe einzugrenzen, wurde deren akute Toxizität bei *N. vitripennis* getestet. Hierfür wurden ausgehend von einer Stammlösung (1 mg/ml, in Aceton) Verdünnungsreihen erstellt und jeweils 210 nl dieser Verdünnungen mit einem Mikroinjektor auf die Abdomenspitze der auf Eis gekühlten Wespen appliziert (je 3 x 8 Männchen und Weibchen pro Wirkstoff und Dosis). Kontrolltiere wurden mit reinem Aceton behandelt. Die Mortalität der Wespen wurde 72 Stunden nach der Applikation bestimmt. Diese Daten wurden mithilfe des [Online-Tools Quest Graph™ LD₅₀ Calculator](#) an eine Sigmoidalfunktion angepasst, um die Dosis-Wirkungsbeziehung der Wirkstoffe zu ermitteln. Zudem wurde die Dosis bestimmt, bei der 50% der behandelten Tiere starben (LD₅₀). Die bei *N. vitripennis* ermittelte akute Toxizität ergab annäherungsweise folgende Reihung: Flupyradifuron < Acetamiprid ≅ Sulfoxaflor < Dimethoat (Tabelle 1, Abbildung 2).

Für die Biotests wurden für jeden Wirkstoff je nach Versuch 2-4 verschiedene subletale Dosen getestet. Für die zu testenden Dosen wurde mit Hilfe der Software die jeweilige Überlebensrate berechnet. Diese sollte möglichst bei ≥ 60% liegen.

Tabelle 1: LD₅₀-Werte und die für die Biotests mit der Art *N. vitripennis* verwendeten subletalen Dosen der vier getesteten Wirkstoffe.

Wirkstoff	LD ₅₀ (ng/Wespe)	In den Biotests getestete Dosen (ng/Wespe)				
		(gemäß Sigmoidalfunktion berechnete Überlebensrate in %)				
Acetamiprid	12,6	0	0,63 (93)	1,05 (89)	2,1 (82)	6,3 (64)
Dimethoat	2,2	0	0,105 (99)	0,21 (97)	0,63 (86)	1,05 (74)
Flupyradifuron	102	0	2,63 (96)	5,25 (93)	21 (80)	
Sulfoxaflor	14,9	0	0,53 (97)	1,05 (94)	2,63 (86)	5,25 (75)

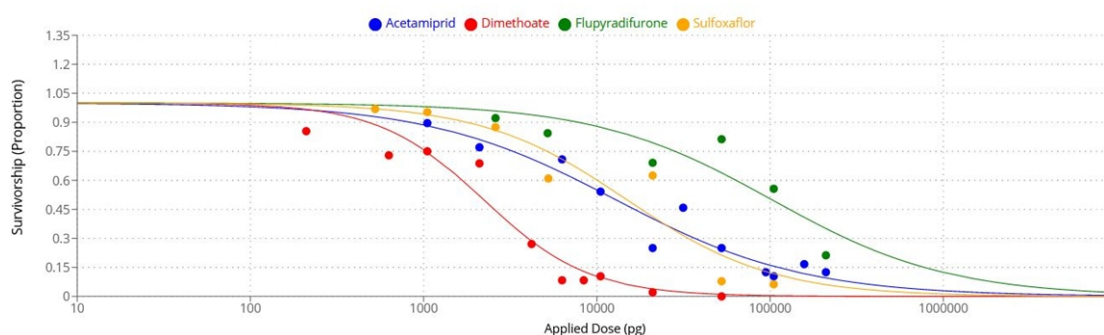


Abbildung 2: Dosis-Wirkungs-Kurven der Wirkstoffe Acetamidrid, Dimethoat, Flupyradifuron und Sulfoxaflor bei *N. vitripennis*. Die Mortalität wurde 72 Stunden nach der Applikation verschiedener Wirkstoffdosen (gelöst in 210 nl Aceton) bestimmt (n = 6 Wiederholungen pro Dosis mit jeweils 8 Individuen).

4.1.2 Effekte auf die Pheromonkommunikation

In diesem Versuch sollte die Reaktion mit subletalen Dosen der vier Wirkstoffe behandelte Weibchen auf das männliche Sexualpheromon untersucht werden. Hierzu wurde ein Vier-Felder-Olfaktometer benutzt [28], welches aus einer kreisrunden Glasarena von 10 cm Durchmesser bestand. Die Arena wurde durch Markierungen in 4 gleichgroße Felder geteilt. In jedem Feld befand sich eine gefräste Mulde (Durchmesser 1 cm). Zwei gegenüberliegende Felder wurden als Test- bzw. Kontrollfeld definiert, die verbleibenden Felder waren neutrale Übergangszonen. In Test- und Kontrollmulde wurden mit einer synthetischen Pheromonlösung (200 ng RS-HDL, 100 ng RR HDL, 5 ng 4-MQ) bzw. Dichlormethan (Kontrolle) behandelte Filterpapierscheibchen platziert. *N. vitripennis*-Weibchen wurden mit 210 nl Aceton (Kontrolle) oder einer der drei bzw. vier subletalen Wirkstoffdosen behandelt und nach 24 Stunden getestet. Es wurde für 5 Minuten aufgenommen, in welcher Mulde sich die Weibchen aufhielten. Die Zeiten in Test- und Kontrollmulde wurden dann mit einem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen statistisch verglichen (n=20 pro Versuch).

Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 3 zusammengefasst. Mit Ausnahme von Sulfoxaflor beeinflussten alle Wirkstoffe bei mindestens einer der getesteten Dosen die Pheromonreaktion unverpaarter *N. vitripennis*-Weibchen. Wie bei der akuten Toxizität zeigte Dimethoat den stärksten Effekt. Ab der niedrigsten getesteten Dosis von 0,105 ng/Wespe wurde die Pheromonorientierung signifikant gestört. Das am wenigsten akut toxische Flupyradifuron wirkte erst ab einer Dosis von 21 ng/Wespe. Interessant ist der Vergleich zwischen Acetamidrid und Sulfoxaflor. Obwohl für beide Wirkstoffe eine ähnliche akute Toxizität ermittelt wurde, unterbrach Acetamidrid bereits ab 0,63 ng/Wespe die Pheromonreaktion der Weibchen, während diese selbst bei einer neunfach höheren Dosis von Sulfoxaflor noch das männliche Pheromon bevorzugten.

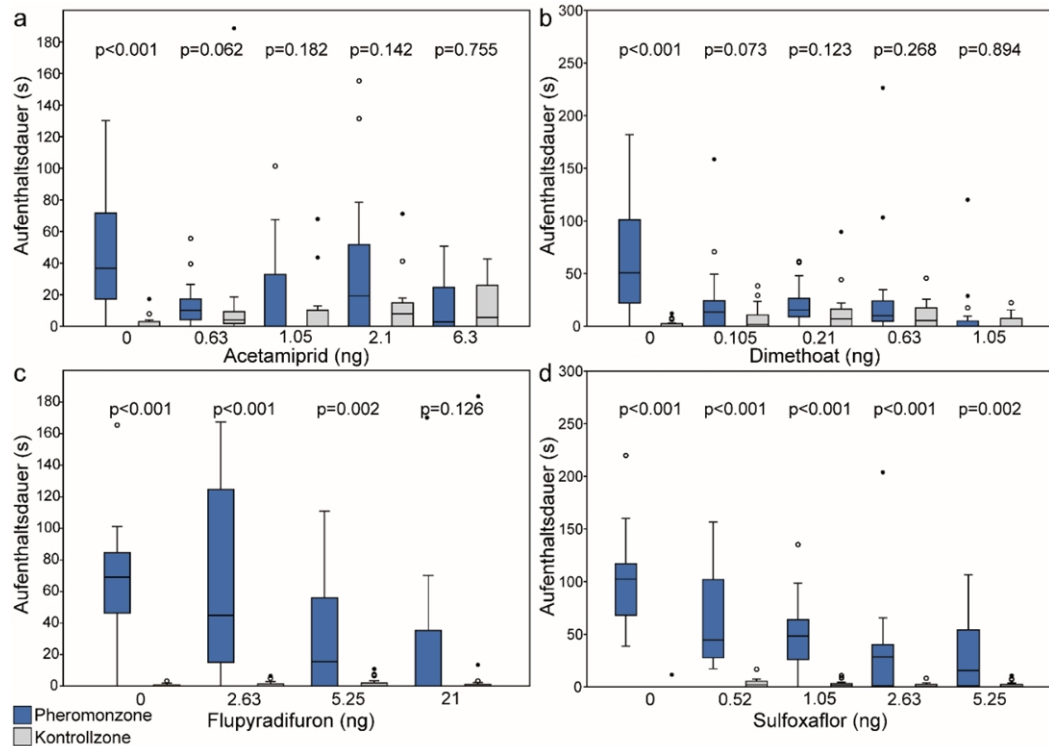


Abbildung 3: Resultate der Pheromonversuche. Dargestellt ist die Zeit, die mit verschiedenen Dosen der Wirkstoffe (a) Acetamidrid, (b) Dimethoat, (c) Flupyradifuron, (d) Sulfoxaflor oder jeweils mit reinem Aceton (0 ng) behandelte *Nasonia vitripennis*-Weibchen in der Pheromon- und der Kontrollzone des Olfaktometers verbrachten. Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker) sowie Ausreißer (°: > 1,5 x Boxhöhe, *: >3 x Boxhöhe). P-Werte < 0.05 zeigen eine signifikante Präferenz der Weibchen für das männliche Sexualpheromon an (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen, n = 20).

4.1.3 Effekte auf die Paarungshäufigkeit

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob subletale Dosen der vier Wirkstoffe das Balz- und Paarungsverhalten behandelter Wespen beeinflussen. Für den Versuch wurden unverpaarte Wespen isoliert und in drei Gruppen aufgeteilt, bei denen (a) nur Weibchen, (b) nur Männchen oder (c) beide Geschlechter mit den Wirkstoffen behandelt wurden (n=20). Es wurden drei subletale Dosen der vier Wirkstoffe sowie reines Aceton (Kontrolle) appliziert. Die Wespen wurden nach 24 Stunden zusammen mit einem Partner in eine runde Plexiglasarena von 1,5 cm Durchmesser überführt, und das Paar wurde für 5 min unter einem Binokular beobachtet. Es wurde notiert, ob eine Kopulation stattfand oder nicht. Daten der behandelten Tiere wurden jeweils mit der Aceton-Kontrolle verglichen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Fisher's Exact-Test.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 4 dargestellt. Der Anteil erfolgreicher Kopulationen von Paaren, bei denen nur die Männchen behandelt wurden, verringerte sich

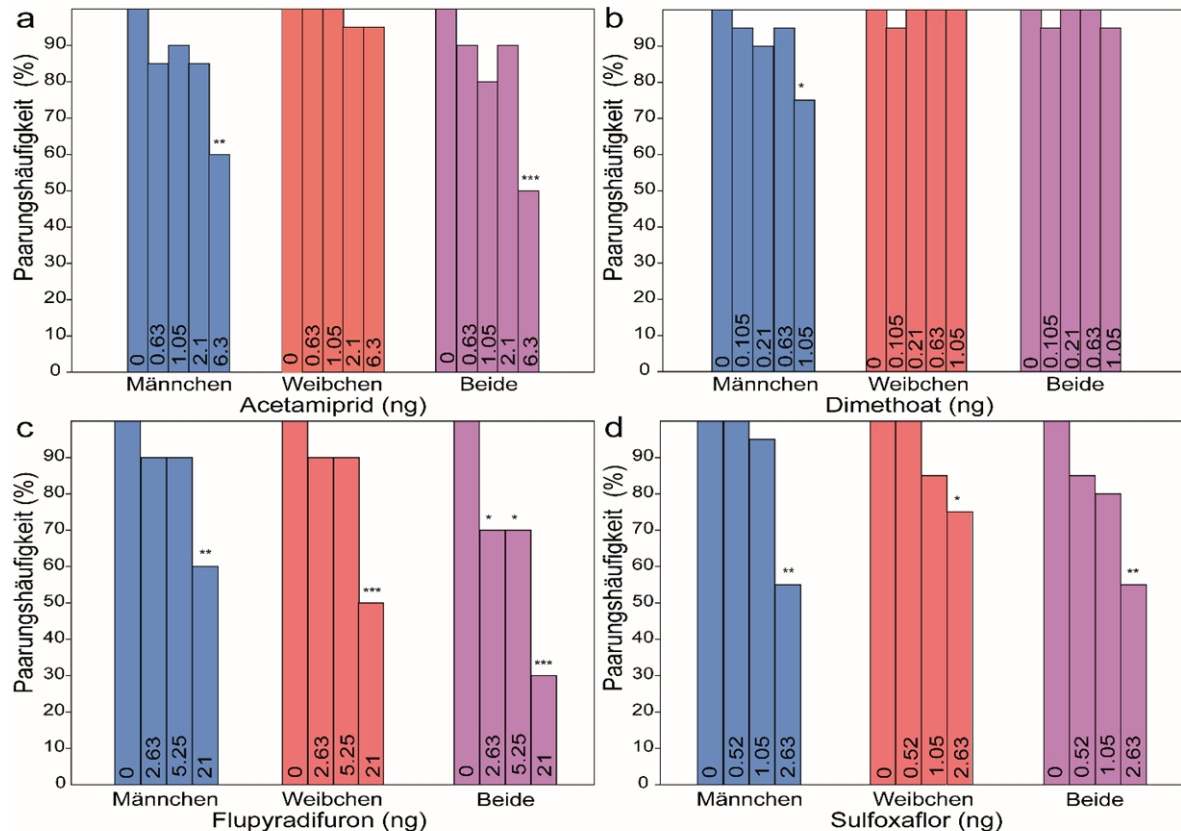


Abbildung 4: Paarungshäufigkeit von *N. vitripennis*-Paaren, bei denen das Männchen, das Weibchen oder beide Partner mit verschiedenen Dosen (Werte in den Säulen in ng) von Acetamidrid, Dimethoat, Flupyradifuron oder Sulfoxaflor behandelt wurden. Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle (0 ng) (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, Fisher's Exact Test, $n=20$).

signifikant bei den jeweils höchsten getesteten Dosen aller vier Wirkstoffe. Wurden nur die Weibchen behandelt, ergaben sich nur bei Flupyradifuron und Sulfoxaflor signifikante Effekte. Wurden beide Partner behandelt, war besonders Flupyradifuron aktiv und verringerte bei allen getesteten Dosen die Paarungshäufigkeit. Acetamidrid und Sulfoxaflor hatten wiederum nur bei der höchsten getesteten Dosis einen Effekt, während Dimethoat die Paarungshäufigkeit in diesem Teilversuch nicht signifikant beeinflusste. Insgesamt zeigen die Paarungsversuche, dass subletale Dosen aller vier Wirkstoffe das Paarungsverhalten von *Nasonia vitripennis* negativ beeinflussen und eine erfolgreiche Paarung sogar vollständig verhindern können.

4.1.4 Effekte auf die Wirtsfindung

In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob die Wahrnehmung wirtsbürtiger Geruchsstoffe durch subletale Dosen der Insektizide beeinträchtigt wird. Es wurden eiablageerfahrene Weibchen im Alter von 24-48 h mit den verschiedenen Wirkstoffdosen behandelt (Kontrolle: reines Aceton) und 24 Stunden nach der Applikation in einem T-Olfaktometer getestet [12]). In dem Olfaktometer konnten die Weibchen für 5 min zwischen dem Geruch ihrer Wirte und keinem Geruch (Kontrolle) wählen. Die Aufenthaltszeiten der Weibchen in Wirts- und Kontrollzone des

Olfaktometers wurden gemessen und mit einem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen verglichen (n=20).

Die Ergebnisse der Wirtsfindungsversuche sind in Abbildung 5 dargestellt. Auch hier zeigten sich drastische Effekte aller vier Wirkstoffe auf das olfaktorische Orientierungsvermögen von *N. vitripennis*-Weibchen. Bei allen getesteten Dosen aller vier Wirkstoffe mit Ausnahme der geringsten Flupyradifuron- und Acetamidrid-Dosen bevorzugten die Weibchen nicht mehr den Geruch ihrer Wirte, während die acetonbehandelten Kontrollweibchen dies durchweg taten. Bemerkenswerterweise schlug die Präferenz bei Behandlung mit Dimethoat-Dosen $\geq 0,21$ ng/Wespe sogar in eine Meidung um. Interessant ist ein Vergleich der Effekte von Sulfoxaflor auf die Pheromonreaktion und das Wirtsfindungsverhalten von *N. vitripennis*-Weibchen. Während die Reaktion auf das männliche Sexualpheromon durch keine der getesteten Dosen unterbrochen wurde (Abbildung 3), störte der Stoff bei allen Dosen die Wahrnehmung von Geruchsstoffen des Wirtes (Abbildung 5).

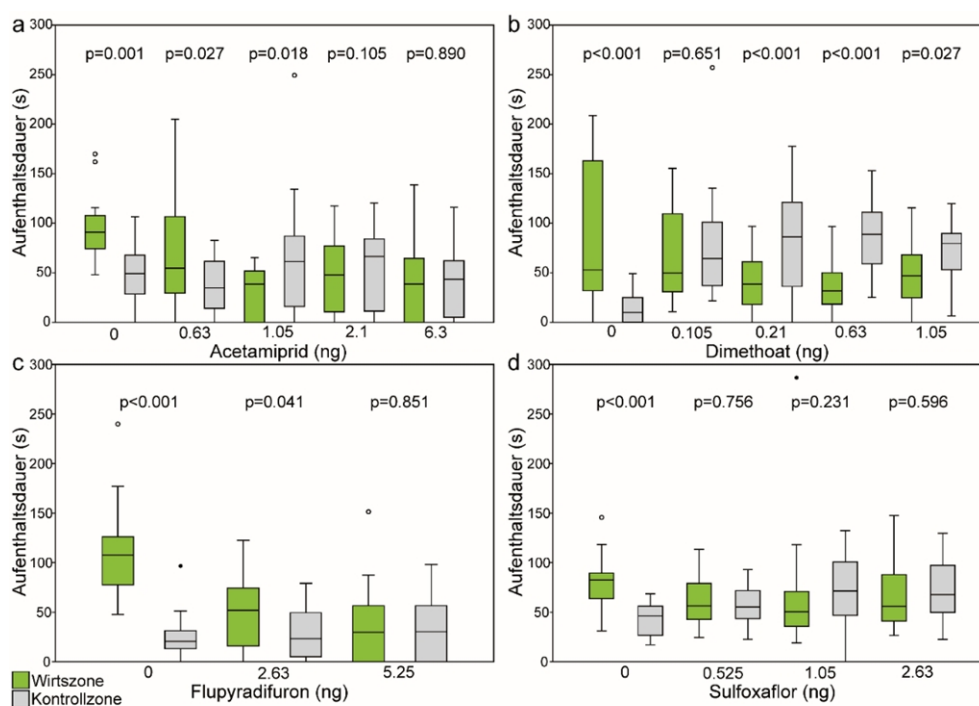


Abbildung 5: Resultate der Wirtsfindungsversuche mit *N. vitripennis*. Dargestellt ist die Zeit, die mit verschiedenen Dosen der Wirkstoffe (a) Acetamidrid, (b) Dimethoat, (c) Flupyradifuron, (d) Sulfoxaflor oder mit reinem Aceton (0 ng) behandelte *Nasonia vitripennis*-Weibchen in der Wirts- und der Kontrollzone des Olfaktometers verbracht haben. Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker) sowie Ausreißer (\circ : $> 1,5 \times$ Boxhöhe, \ast : $>3 \times$ Boxhöhe). P-Werte < 0.05 zeigen eine signifikante Präferenz bzw. Meidung (a, b) des Wirtsgeruches durch die Weibchen an (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen, n = 20).

4.1.5 Effekte auf die Fertilität

Um zu untersuchen, ob subletale Dosen der vier Wirkstoffe die Fertilität der Weibchen beeinträchtigen, wurden unverpaarte Weibchen isoliert und mit verschiedenen Insektizid-Dosen behandelt. 24 Stunden nach der Applikation wurden die Weibchen verpaart und in einer Petrischale mit 10 Wirtspuppen zur Eiablage versorgt. 48 Stunden nach der Paarung wurden 10 weitere Wirtspuppen hinzugefügt. Die Petrischalen wurden 4 Wochen in einem Wärmeschrank gelagert, bis alle Nachkommen geschlüpft waren. Die Anzahl der Nachkommen pro Weibchen wurde ausgezählt und mit einem Kruskal-Wallis-Test sowie, wenn dieser signifikant war, mit multiplen Mann-Whitney U-Tests verglichen. Die Effekte der vier Wirkstoffe auf die Nachkommenzahl von *N. vitripennis*-Weibchen waren gering (Tabelle 2). Lediglich bei der höchsten Dosis von Acetamidrid und der geringsten Dosis von Sulfoxaflor verringerte sich die Nachkommenzahl signifikant. Warum bei Sulfoxaflor der Effekt bei den höheren Dosen wieder verloren ging, scheint auf den ersten Blick schwer nachvollziehbar. Jedoch sind solche biphasischen Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Biologie, Toxikologie und Medizin keine Seltenheit [29].

Tabelle 2: Resultate und statistische Auswertung der Versuche zur Fertilität von *Nasonia vitripennis*-Weibchen, die mit verschiedenen Wirkstoffdosen oder reinem Aceton (0 ng, Kontrolle) behandelt wurden. P-Werte < 0.05 (rote Felder) zeigen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle an.

Acetamidrid	Kruskal-Wallis P= 0.01451			
Dosis	0ng	1.05ng	2.1ng	6.3ng
Nachkommen (MW ± SD)	157 ± 41	134 ± 48	152 ± 40	125 ± 39
Dunn's Test p-Wert		0.1849	0.7867	0.004691
Dimethoat	Kruskal-Wallis p-Wert P=0.07257			
Dosis	0ng	0.21ng	0.63ng	1.05ng
Nachkommen (MW ± SD)	140 ± 41	121 ± 36	111 ± 46	115 ± 51
Flupyradifuron	Kruskal-Wallis P=0.6878			
Dosis	0ng	2.63ng	5.25ng	21ng
Nachkommen (MW ± SD)	127 ± 62	127 ± 38	135 ± 51	119 ± 78
Sulfoxaflor	Kruskal-Wallis P=0.03373			
Dosis	0ng	0.52ng	1.05ng	2.63ng
Nachkommen (MW ± SD)	136 ± 40	96 ± 55	127 ± 38	123 ± 25
Dunn's Test p-Wert		0.01057	0.4818	0.06782

4.2 Versuche mit dem Modellsystem *Lariophagus distinguendus*

Die Art *L. distinguendus* ist ein kosmopolitisch verbreiteter Larval- und Puppenparasitoid verschiedener Käferarten, die sich in gelagertem Getreide vermehren [30]. Für die Versuche wurde *L. distinguendus* auf 21-28 Tage alten Larven/Präpuppen des Kornkäfers *Sitophilus granarius* gezüchtet, die wiederum auf Weizenkörnern gezogen wurden. Auch *L. distinguendus*-Männchen nutzen zur Partnererkennung ein Sexualpheromon, welches aus cuticulären Kohlenwasserstoffen der Weibchen besteht und wie bei *N. vitripennis* ein stereotypisches Balzverhalten auslöst [31, 32]. Es wird erst bei Kontakt wahrgenommen, wenn sich die Partner in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Als charakteristisches Element des Balzverhaltens zeigen die Männchen ein hochfrequentes Flügelschwirren (*wing fanning*), welches sich leicht

beobachten und quantifizieren lässt [33]. Nach einer erfolgreichen Paarung suchen *L. distinguendus* Weibchen nach geeigneten Wirten, um ihre Eier abzulegen. Die Weibchen finden ihre Wirte durch Geruchsstoffe, die von dem Larvalkot der Larven abgegeben werden [34, 35].

4.2.1 Verabreichung der Wirkstoffe

Die Applikation der vier Wirkstoffe erfolgte, wie für *N. vitripennis* beschrieben. Wie bei *N. vitripennis* wurden für die Biotests 2-3 Dosen getestet (Tabelle 1). Die bei *L. distinguendus* ermittelte akute Toxizität ergab annäherungsweise folgende Reihung: Dimethoat < Flupyradifuron \cong Acetamidrid < Sulfoxaflor (Tabelle 1, Abbildung 6).

Tabelle 3: LD₅₀-Werte und die für die Biotests mit der Art *L. distinguendus* verwendeten subletalen Dosen der vier getesteten Wirkstoffe.

Wirkstoff	LD ₅₀ (ng/Wespe)	In den Biotests getestete Dosen (ng/Wespe) (gemäß Sigmoidalfunktion berechnete Überlebensrate in %)			
		0	0,105	0,21	0,42
Acetamidrid	0,54	0 (98)	0,105 (92)	0,21 (82)	0,42 (60)
Dimethoat	1,9	0 (92)	0,105 (92)	0,21 (91)	0,63 (85)
Flupyradifuron	0,75	0 (92)	0,105 (92)	0,21 (90)	0,42 (78)
Sulfoxaflor	0,21	0 (95)	0,021 (94)	0,063 (90)	0,105 (80)

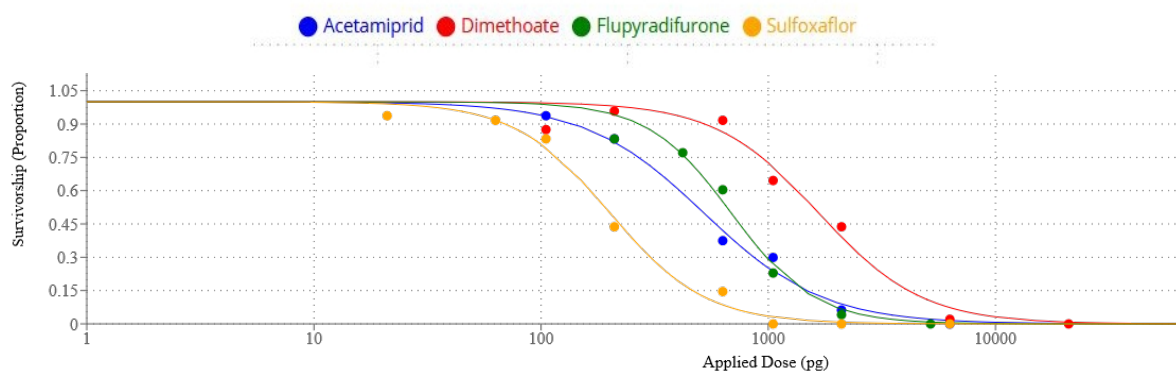


Abbildung 6: Dosis-Wirkungs-Kurven der Wirkstoffe Acetamidrid, Dimethoat, Flupyradifuron und Sulfoxaflor für *L. distinguendus*. Die Mortalität wurde 72 Stunden nach der Applikation verschiedener Wirkstoffdosen (gelöst in 210 nl Aceton) bestimmt (n = 6 Wiederholungen pro Dosis mit jeweils 8 Individuen).

4.2.2 Effekte auf die Pheromonkommunikation

In diesem Versuch wurde die Reaktion von mit subletalen Dosen der vier Wirkstoffe behandelten Männchen auf das weibliche Sexualpheromon untersucht. Da diese nicht in synthetischer Form verfügbar sind, wurde den Männchen in diesem Versuch als Pheromonquelle ein frisch getötetes Weibchen (*Dummy*) präsentiert. Männchen wurden mit 210 nl reinem Aceton

(Kontrolle) oder einer subletalen Dosis der vier Wirkstoffe behandelt und 24 Stunden später getestet. Das Männchen wurde zu dem *Dummy* in eine Beobachtungsarena gesetzt, und es wurden für 5 Minuten die Anzahl von Flügelschwirrserien (*wing fanning*) aufgenommen. Die Daten wurden mit einem Kruskal-Wallis Test über alle Dosen hinweg analysiert. Wenn dieser signifikant war, wurden die einzelnen subletalen Dosen und die Kontrolle jeweils mit einem Dunn's Test verglichen (n=20 pro Behandlung).

Die Ergebnisse der Pheromonversuche sind in Abbildung 7 dargestellt. Alle 4 Wirkstoffe hatten einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der Flügelschwirrserien. Sulfoxaflor zeigte hier den stärksten Effekt und bewirkte bereits ab einer Dosis von 0,021 ng/Wespe eine signifikante Schwächung der Pheromonreaktion. Die Anzahl der Flügelschwirrserien gegenüber dem *Dummy* waren signifikant verkürzt.

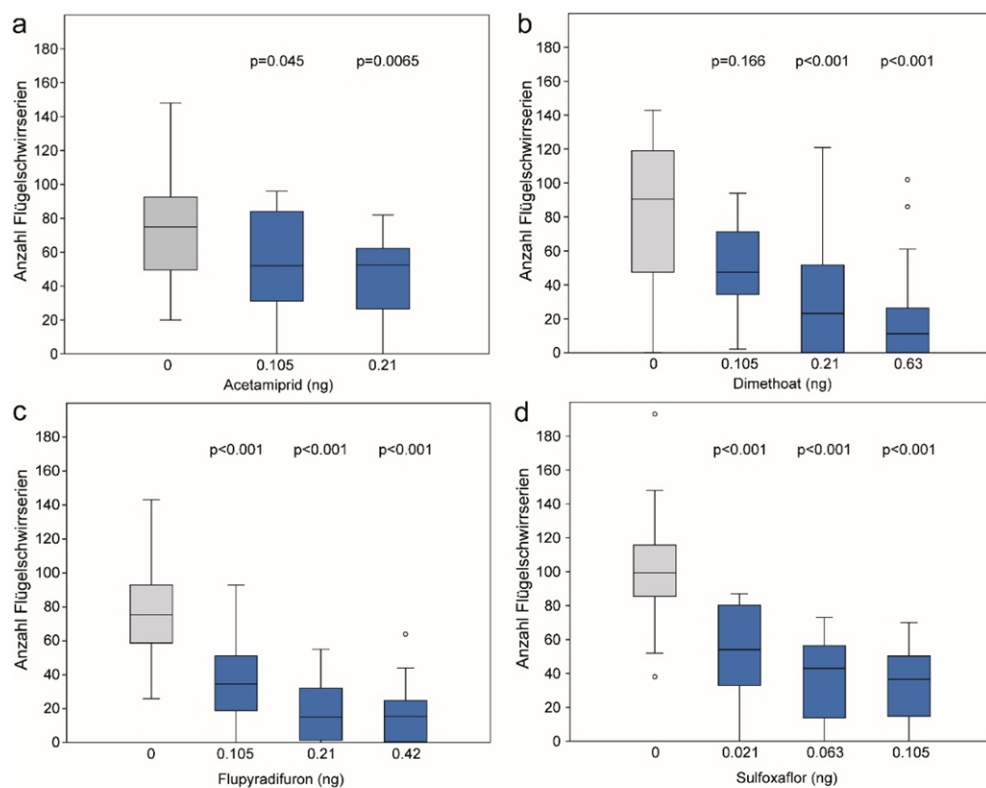


Abbildung 7: Resultate der der Pheromonversuche mit *L. distinguendus*. Anzahl der Flügelschwirrserien (*wing fanning*), die mit verschiedenen Dosen der Wirkstoffe (a) Acetamidrid, (b) Dimethoat, (c) Flupyradifuron, (d) Sulfoxaflor oder jeweils mit reinem Aceton (0 ng) behandelte *L. distinguendus*-Männchen gegenüber einem toten Weibchen (*Dummy*) zeigten. Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker) sowie Ausreißer (°: > 1,5 x Boxhöhe, *: > 3 x Boxhöhe). P-Werte < 0,05 zeigen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle an, Kruskal-Wallis Test und Dunn's-Test für Einzelvergleiche, n = 20).

4.2.3 Effekte auf die Paarungshäufigkeit

Im Paarungsversuch wurde untersucht, ob die subletalen Dosen der vier Wirkstoffe einen Einfluss auf den Paarungserfolg der behandelten Wespen haben. Nachdem das Männchen die cuticulären Pheromone des Weibchens erkannt hat, beginnt die Balz. Das Männchen reagiert mit *wing fanning* auf die cuticulären Kohlenwasserstoffe [31] und steigt auf das Weibchen. Auf dem Weibchen streicht das Männchen die Innenseiten seiner Antennen über die Außenseiten der Antennen des Weibchens, während es weiter *wing fanning* zeigt. Wenn das Weibchen das Männchen als Partner akzeptiert, öffnet es seine Genitaltasche und eine Kopulation findet statt. Wie bei *N. vitripennis* wurden die Wespen vor dem Schlüpfen isoliert und in drei Gruppen aufgeteilt. In den Gruppen wurden entweder nur Weibchen, nur Männchen oder beide Geschlechter mit einer Wirkstoffdosis oder zur Kontrolle mit reinem Aceton behandelt (n=20 pro Dosis/Gruppe). Frisch geschlüpfte Wespen wurden 24 Stunden nach der Applikation getestet. Die Paare wurden, Weibchen zuerst, in eine Plexiglasarena überführt, und es wurde für 5 min unter einem Binokular beobachtet, ob es zu einer Kopulation kam. Die Zahl erfolgreicher Kopulationen wurde zwischen behandelten und Kontrolltieren mit einem Fisher's Exact-Test verglichen (n = 20 für alle Versuche).

Die Zahl erfolgreicher Kopulationen wurde durch die Behandlung mit subletalen Dosen der Wirkstoffe verringert (Abbildung 8). Bei Behandlung der Männchen geschah dies für Acetamidrid, Flupyradifuron und Sulfoxaflor bei mindestens einer Dosis, während Dimethoat hier bei den getesteten Dosen keine signifikanten Effekte zeigte.

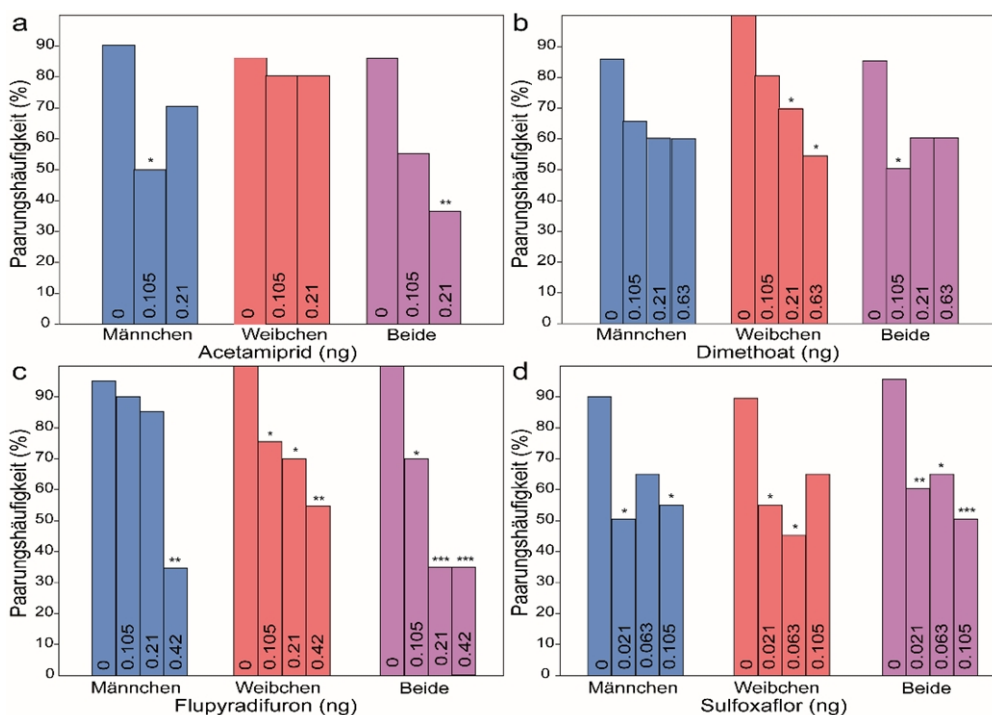


Abbildung 8: Paarungshäufigkeit von *L. distinguendus*-Paaren, bei denen das Männchen, das Weibchen oder beide Partner mit verschiedenen Dosen (Werte in den Säulen in ng) von Acetamidrid, Dimethoat, Flupyradifuron oder Sulfoxaflor behandelt wurden. Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle (0 ng) (* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001, Fisher's Exact Test, n=20).

Wurden die Weibchen behandelt, beeinflusste dies die Kopulationsrate für Dimethoat, Flupyradifuron und Sulfoxaflor, während hier Acetamiprid keine signifikanten Effekte zeigte. Wurden beide Partner behandelt, bewirkten alle Substanzen bei mindestens einer Dosis signifikante Abnahmen der Paarungsraten. Sulfoxaflor und Flupyradifuron waren hier bei allen getesteten Dosen wirksam.

4.2.4 Effekte auf die Wirtsfindung

Um zu untersuchen, ob die vier Wirkstoffe die Wirtsfindung der Weibchen beeinflussen, wurden verpaarte Weibchen mit subletalen Dosen der vier Wirkstoffe oder mit reinem Aceton (Kontrolle) behandelt und in einem 4-Felder-Olfaktometer getestet [35]. Das 4-Felder-Olfaktometer war in vier Kammern aufgeteilt, von denen zwei gegenüberliegende mit dem Test- bzw. Kontrollstimulus bestückt wurden (Kammer 1: Petrischale mit 150 mg Larvarkot von *S. granarius*, Kammer 3: leere Petrischale). Über den Kammern befand sich eine Laufarena aus luftdurchlässiger, aber undurchsichtiger Polyamidgaze, sodass sich über den Kammern „Duftfelder“ ausbilden können. Die Weibchen wurden in eine zentrale Vertiefung der Laufarena überführt und konnten sich auf der Polyamidgaze frei bewegen. Die Aufenthaltszeiten der Weibchen in den Duftfeldern (Zone 1 und Zone 3) wurden für 5 min mittels der Observer XT 15 Software gemessen und anschließend mit einem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen ausgewertet (n=20). Die Ergebnisse der Wirtsfindungsversuche sind in Abbildung 9 dargestellt. Im Gegensatz zu den Paarungsversuchen, aber in Übereinstimmung mit *Nasonia vitripennis* hatte hier Acetamiprid einen starken Effekt auf die olfaktorische Reaktion der Weibchen. Dimethoat und Sulfoxaflor störten die Wirtsfindung jeweils nur bei den höchsten getesteten Dosen. Bei Flupyradifuron gab es bei der geringsten Dosis einen Effekt, der aber bei höheren Dosen nicht mehr auftrat. Jedoch waren hier die Präferenzen der behandelten Tiere für den Wirtsgeruch im Vergleich zu den Kontrollen sehr viel schwächer ausgeprägt.

4.2.5 Effekte auf die Fertilität

Die bislang dargestellten Versuche zur Partner- und Wirtsfindung beeinflussen den Fortpflanzungserfolg von *L. distinguendus* indirekt. In diesem Experiment wurde nun untersucht, ob subletale Dosen der vier Wirkstoffe die Fertilität behandelter Weibchen auch direkt beeinflussen. Hierzu wurden Weibchen vor dem Schlüpfen isoliert und nach dem Schlupf mit einer subletalen Wirkstoffdosis oder reinem Aceton (Kontrolle) behandelt. 24 Stunden nach der Behandlung wurden die Weibchen mit einem Männchen verpaart. Wenn die Paarung erfolgreich war, wurden die Weibchen zur Eiablage in eine Petrischale gesetzt, die 100, von *S. granarius* befallene Weizenkörner enthielt. 48 Stunden nach der Paarung wurden erneut 100 befallene Körner hinzugefügt. Um sicherzustellen, dass alle Nachkommen schlüpfen konnten, wurden die Petrischalen für 5 Wochen bei 25 °C in einem Wärmeschrank gelagert. Die Zahl der Nachkommen wurde ausgezählt und mit einem Kruskal-Wallis-Test analysiert. War dieser signifikant, erfolgte ein Vergleich der Einzeldosen mit der Acetonkontrolle mittels Dunn's Test für Einzelvergleiche. Die Ergebnisse der Fertilitätstests sind in Tabelle 4 dargestellt. Demnach verringerte nur die höchste Dosis von Dimethoat die Anzahl der Nachkommen signifikant.

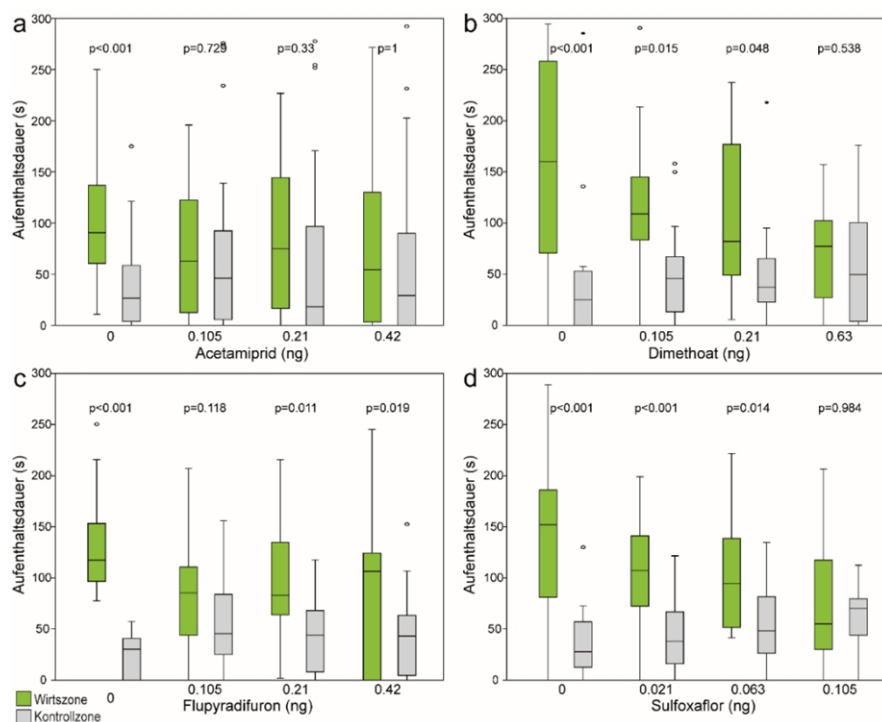


Abbildung 9: Resultate der Wirtsfindungsversuche mit *L. distinguendus*. Dargestellt ist die Zeit, die mit verschiedenen Dosen der Wirkstoffe (a) Acetamidrid, (b) Dimethoat, (c) Flupyradifuron, (d) Sulfoxaflor oder jeweils mit reinem Aceton (0 ng) behandelte *L. distinguendus*-Weibchen in der Wirts- und der Kontrollzone des Olfaktometers verbracht haben. Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker) sowie Ausreißer (°: > 1,5 x Boxhöhe, *: >3 x Boxhöhe). P-Werte < 0.05 zeigen eine signifikante Präferenz der Weibchen für den Geruch des Larvalkots von Kornkäfern (*Sitophilus granarius*) an (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen, n = 20).

Tabelle 4: Resultate und statistische Auswertung der Fertilitätstests mit *Lariophagus distinguendus*-Weibchen, die mit verschiedenen Wirkstoffdosen oder reinem Aceton (0 ng, Kontrolle) behandelt wurden. P-Werte < 0.05 (rote Felder) zeigen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle an (n=20).

Acetamidrid	Kruskal-Wallis: P=0.4798			
Dosis	0ng	0.105ng	0.21ng	
Nachkommen (MW ± SD)	58±31	63±29	74±24	
Dimethoat	Kruskal-Wallis: P=0.006481			
Dosis	0ng	0.105ng	0.21ng	0.63ng
Nachkommen (MW ± SD)	74±32	72±23	71±31	40±36
Dunn's Test p-Wert		1	1	0.0053
Flupyradifuron	Kruskal-Wallis: P=0.30169			
Dosis	0ng	0.105ng	0.21ng	0.42ng
Nachkommen (MW ± SD)	43±16	43±16	37±23	48±26
Sulfoxaflor	Kruskal-Wallis: P=0.5061			
Dosis	0ng	0.021ng	0.063ng	0.105ng
Nachkommen (MW ± SD)	68±21	69±24	51±32	62±32

4.3 Versuche mit dem Modellsystem *Leptopilina heterotoma*

Die Art *L. heterotoma* ist ein solitärer Larvalparasitoid aus der Familie Figitidae, der verschiedene *Drosophila*-Arten einschließlich *D. melanogaster* parasitiert und in der Holarktis weit verbreitet ist. Für die Versuche wurde *L. heterotoma* auf 2-3 Tage alten Larven von *D. melanogaster* gezüchtet [36]. Weibchen von *L. heterotoma* produzieren in ihrer Mandibeldrüse ein Gemisch von sogenannten Iridoiden mit der Verbindung (-)-Iridomyrmecin als Hauptkomponente [37]. Die Iridoide der Weibchen fungieren sowohl als Abwehrsubstanzen als auch als Sexualpheromon, welches arteigene Männchen über größere Entfernungen (ohne Kontaktmöglichkeit) anlockt und im Nahbereich Balzverhalten auslöst [37]. Wie bei *L. distinguendus* reagieren die Männchen während der Balz auf das Pheromon, indem sie ein hochfrequentes Flügelschwirren (*wing fanning*) zeigen. Nach einer erfolgreichen Paarung suchen *L. heterotoma*-Weibchen nach geeigneten Wirten, um ihre Eier abzulegen. Die Weibchen finden ihre Wirte ebenfalls durch Geruchsstoffe. In früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass *L. heterotoma*-Weibchen in einem Olfaktometer auf den Geruch eines mit *Drosophila*-Larven besetzten Nährmediums reagieren [37].

4.3.1 Verabreichung der Wirkstoffe

Die Applikation der vier Wirkstoffe erfolgte, wie für *N. vitripennis* beschrieben. Für alle Biotests wurden jeweils 3 Dosen getestet, bei denen mindestens 60% der behandelten Tiere überleben (Tabelle 1). Für die Untersuchung der Effekte der Wirkstoffe auf das pheromonvermittelte Balzverhalten im Nahbereich (4.3.2.2) wurden jeweils drei weitere Dosen getestet, um exemplarisch eine Dosis-Wirkungsbeziehung zu ermitteln. Die bei *L. heterotoma* ermittelte akute Toxizität ergab annäherungsweise folgende Reihung: Flupyradifuron < Acetamiprid < Dimethoat \cong Sulfoxaflor (Tabelle 5, Abbildung 10).

Tabelle 5: LD₅₀-Werte und die für die Biotests mit der Art *L. heterotoma* verwendeten subletalen Dosen der vier getesteten Wirkstoffe.

Wirkstoff	LD ₅₀ (ng/Wespe)	In den Biotests getestete Dosen (ng/Wespe) (gemäß Sigmoidalfunktion berechnete Überlebensrate in %)						
		0	0,105*	0,21	0,42	0,525*	0,63	1,05*
Acetamiprid	3,0	0 (93)	0,105* (91)	0,21 (89)	0,42 (85)	0,525* (82)	0,63 (80)	1,05* (72)
Dimethoat	1,5	0 (96)	0,053* (94)	0,105 (93)	0,21 (88)	0,315* (76)	0,42 (80)	0,63* (72)
Flupyradifuron	43	0 (89)	2,1* (89)	6,3 (86)	10,5 (81)	15,8* (75)	21 (68)	63* (30)
Sulfoxaflor	1,2	0 (96)	0,105* (96)	0,21 (95)	0,42 (89)	0,525* (85)	0,63 (80)	1,05* (58)

*nur für die Untersuchung der Effekte auf das Balzverhalten in Nahbereich (4.3.2.2)

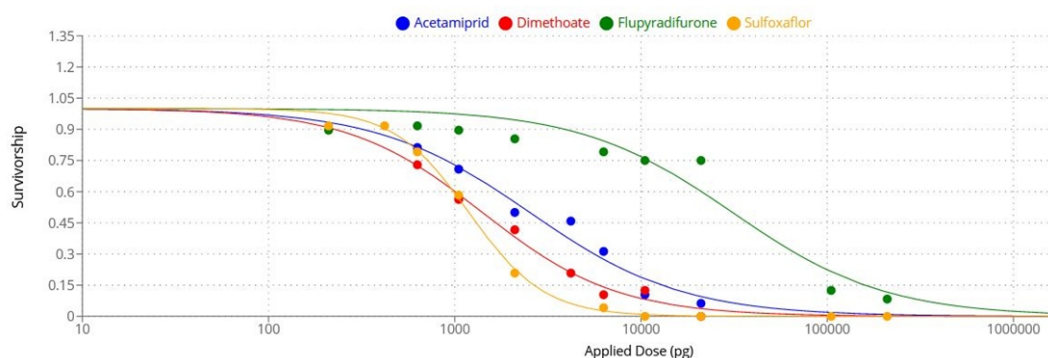


Abbildung 10: Dosis-Wirkungs-Kurven der Wirkstoffe Acetamidrid, Dimethoat, Flupyradifuron und Sulfoxaflor für *L. heterotoma*. Die Mortalität wurde 72 Stunden nach der Applikation verschiedener Wirkstoffdosen (gelöst in 210 ml Aceton) bestimmt (n = 6 Wiederholungen pro Dosis mit jeweils 8 Individuen).

4.3.2 Effekte auf die Pheromonkommunikation

4.3.2.1 Effekte auf die Fernorientierung der Männchen

Um zu testen, ob die Fernwahrnehmung (ohne Kontakt) des Weibchenpheromons durch subletale Dosen der Wirkstoffe beeinträchtigt wird, wurden unverpaarte Männchen mit verschiedenen Dosen der Wirkstoffe behandelt und in dem beschriebenen T-Olfaktometer getestet. Im Unterschied zu den bisher beschriebenen T-Olfaktometer-Versuchen mit *N. vitripennis* (siehe Abschnitt 4.1.4) wurde das Olfaktometer in diesem Experiment senkrecht mit der Startzone nach unten aufgestellt. Dies bewirkte aufgrund der negativ geotaktischen und positiv phototaktischen Reaktion, die viele Insekten zeigen [38], eine höhere Aktivität der *L. heterotoma*-Wespen. Für diesen Versuch wurden die Aufenthaltsdauern der männlichen Wespen in einer Pheromonzone und einer Kontrollzone verglichen. Am Ende der Pheromonzone befand sich ein Eppendorfgefäß mit einem Stück Filterpapier auf das 5 µl eines Weibchenextraktes (entsprechend 0,5 Weibchenäquivalente) appliziert wurde. Die Kontrollzone wurde mit reinem Lösungsmittel behandelt. Die Männchen wurden in die Startzone gesetzt, und es wurde fünf Minuten lang mithilfe der Observer XT 15 Software aufgenommen, in welcher Zone sie sich aufhielten. Die Zeiten, die die Männchen in der Pheromon- bzw. Kontrollzone verbracht hatten, wurden mit einem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen verglichen (n=30).

Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 11 zusammengefasst. Die mit Aceton behandelten Männchen bevorzugten in allen Kontrollversuchen hochsignifikant den von Weibchen stammenden Pheromonextrakt. Jedoch beeinflussten alle vier Wirkstoffe bei jeder der getesteten subletalen Dosen die Reaktion der *L. heterotoma*-Männchen auf das weibliche Sexualpheromon. Die Aufenthaltsdauern der Männchen in Pheromon- und Kontrollzone unterschieden sich bei den behandelten Männchen nicht mehr signifikant.

4.3.2.2 Effekte auf das Balzverhalten in Nahbereich

Die Reaktion der Männchen auf das weibliche Sexualpheromon im Nahbereich wurde prinzipiell durchgeführt, wie in Abschnitt 4.2.2 für *L. distinguendus* beschrieben. Abweichend hiervon wurde den Männchen jedoch kein Weibchen-Dummy, sondern ein aus Weibchen hergestellter

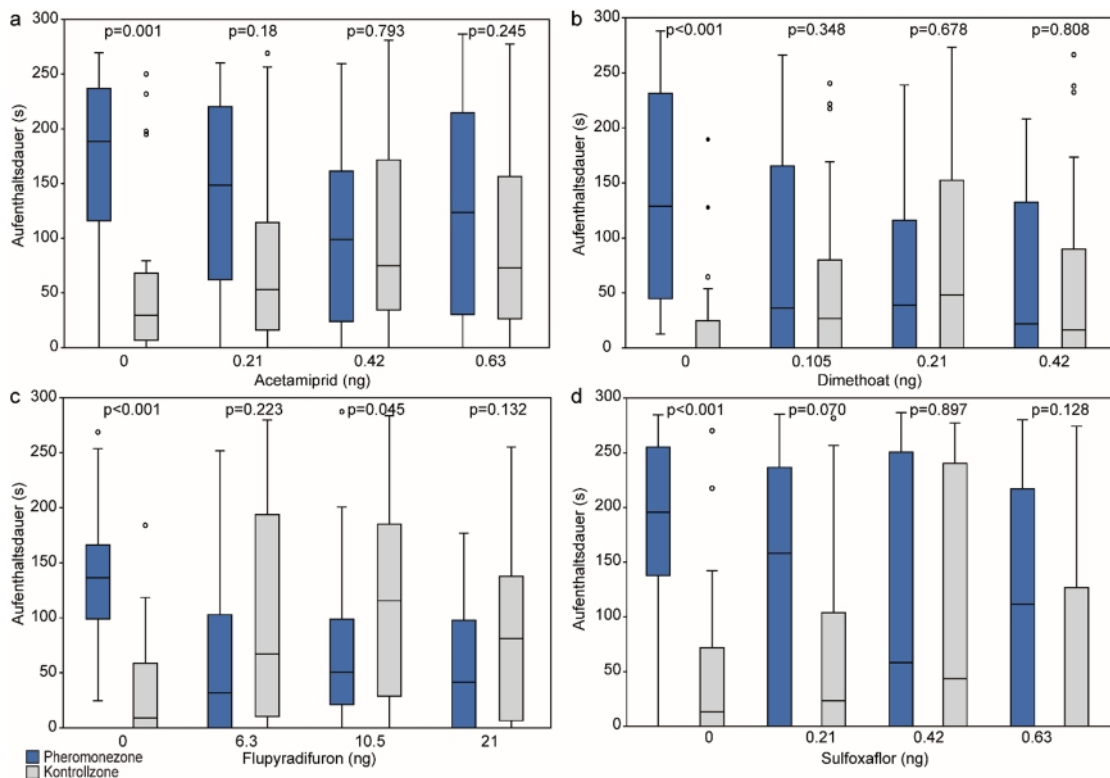


Abbildung 11: Resultate der Pheromonversuche (Fernorientierung) mit *L. heterotoma*. Dargestellt ist die Zeit, die mit verschiedenen Dosen der Wirkstoffe (a) Acetamidiprid, (b) Dimethoat, (c) Flupyradifuron oder (d) Sulfoxaflor sowie mit reinem Aceton (0 ng) behandelte *L. heterotoma*-Männchen in der Pheromon- und der Kontrollzone des Olfaktometers verbracht haben. Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker) sowie Ausreißer (°: > 1,5 x Boxhöhe, *: >3 x Boxhöhe). P-Werte < 0.05 zeigen eine signifikante Präferenz der Männchen für eine der beiden Zonen an (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen, n = 20).

Pheromonextrakt (5 µl entsprechend 0,5 Weibchenäquivalenten) präsentiert. Hierzu wurde der Extrakt auf ein Filterpapierscheibchen appliziert, und es wurde nach Abdampfen des Lösungsmittels über 5 min hinweg aufgenommen, wie lange die Männchen Flügelschwirren zeigten. Zum Vergleich wurde Kontrolltieren mit Lösungsmittel behandelte Papierscheibchen angeboten. Da die Flügelschwirrserien bei *L. heterotoma* deutlich länger andauern als bei *L. distinguendus*, wurde nicht deren Häufigkeit, sondern deren Gesamtdauer aufgenommen. Die statistische Analyse erfolgte zunächst mit einem Kruskal-Wallis-Test über alle Dosen hinweg. War dieser signifikant, erfolgten Vergleiche der Einzeldosen mit der Kontrolle mithilfe des Dunn's-Tests (n=30). Für diesen Test wurden zusätzlich drei weitere Wirkstoffdosen getestet (siehe Tabelle 5), um die Wirkschwelle der getesteten Insektizide genauer eingrenzen zu können. Anders als bei den bisherigen Versuchen waren darunter auch solche, die Mortalitäten > 40 % verursachten. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 12 und Abbildung 13 dargestellt. Alle 4 Wirkstoffe hatten bei mindestens

drei von 6 getesteten Dosen einen signifikanten Einfluss auf die Dauer des Flügelschwirrverhaltens. Die Anzahl der Flügelschwirrserien gegenüber dem Pheromonextrakt war jeweils signifikant verkürzt. Acetamidrid und Dimethoat wirkten ab einer Dosis von 0,21 ng, Sulfoxaflor ab 0,525 ng während Flupyradifuron bei allen getesteten Dosen wirkte ($\geq 2,1$ ng). Für alle vier Wirkstoffe lagen die niedrigsten aktiven Dosen in Bereichen, bei denen ca. 90% der behandelten Wespen überleben (Tabelle 5). Auch der Anteil von Männchen, die überhaupt keine Reaktion mehr auf das Pheromon zeigten, wurde durch alle vier Wirkstoffe dosisabhängig verringert (Abbildung 13). Die Daten dieses Versuches wurden mithilfe des [Online-Tools Quest Graph™ LD₅₀ Calculator](#) an eine Sigmoidalfunktion angepasst, um Dosis-Wirkungsbeziehungen der Wirkstoffe zu ermitteln (Abbildung 14).

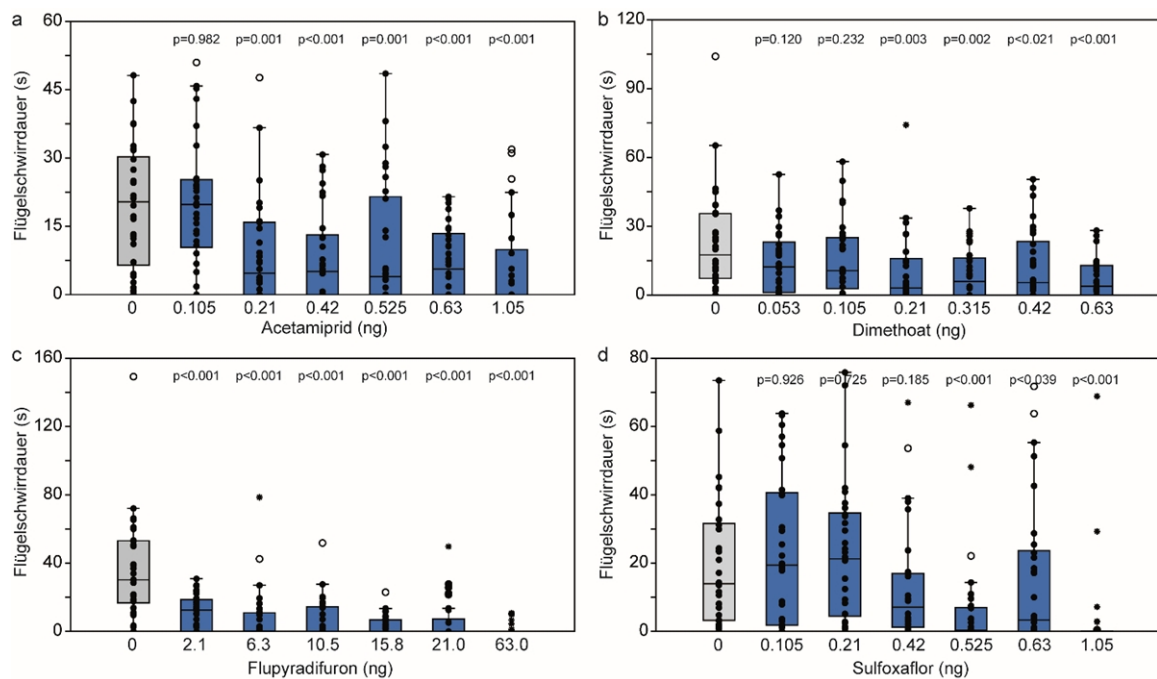


Abbildung 12: Resultate der der Pheromonversuche (Balzverhalten im Nahbereich) mit *L. heterotoma*. Dauer des Flügelschirrens (wing fanning), die mit verschiedenen Dosen der Wirkstoffe (a) Acetamidrid, (b) Dimethoat, (c) Flupyradifuron oder (d) Sulfoxaflor sowie mit reinem Aceton (0 ng) behandelte *L. heterotoma*-Männchen gegenüber einem Pheromonextrakt zeigten. Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker) sowie Ausreißer (°: > 1,5 x Boxhöhe, *: >3 x Boxhöhe). P-Werte <0,05 zeigen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle an, Kruskal-Wallis Test und Dunn's-Test für Einzelvergleiche, n = 20).

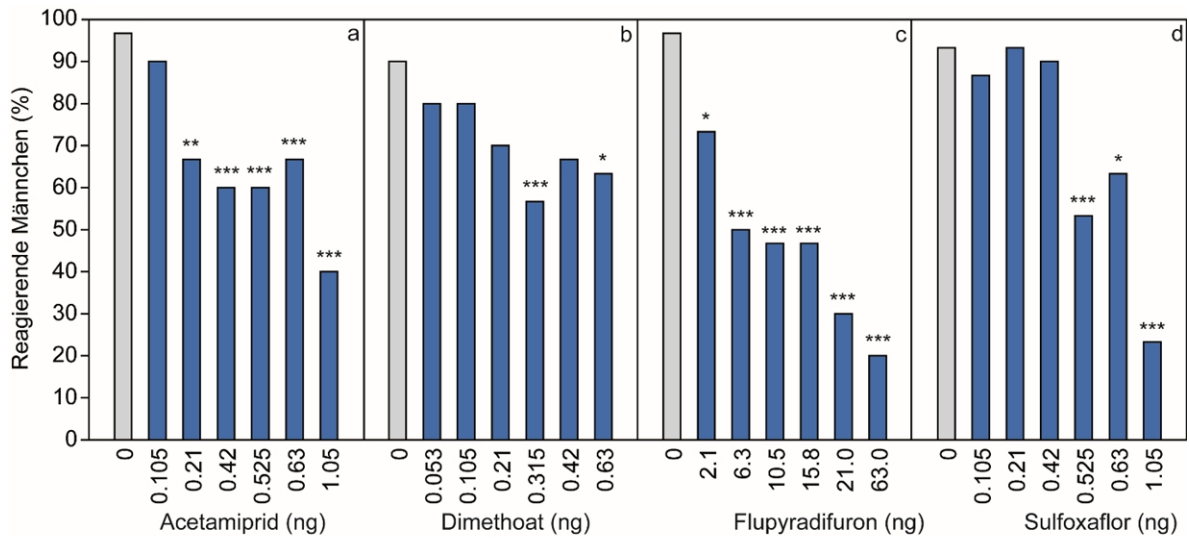


Abbildung 13: Resultate der Pheromonversuche (Balzverhalten im Nahbereich) mit *L. heterotoma*. Anteil der Männchen, die auf den Weibchenextrakt mit Flügelchwirren (wing fanning) reagierten. Männchen wurden mit verschiedenen Dosen der Wirkstoffe (a) Acetamidrid, (b) Dimethoat, (c) Flupyradifuron oder (d) Sulfoxaflor sowie mit reinem Aceton (0 ng) behandelt. Mit Sternchen gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant von der jeweiligen Kontrolle (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, Fisher's Exact Test, $n = 20$).

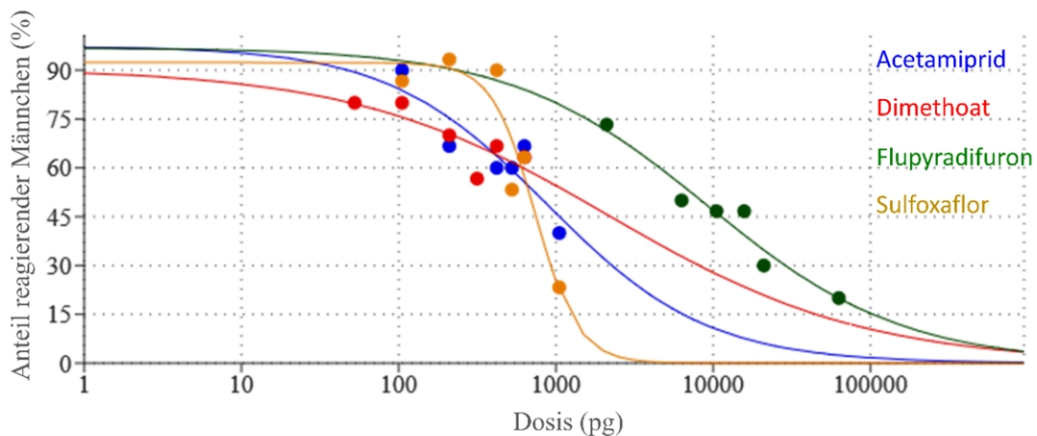


Abbildung 14: Dosis-Wirkungsbeziehungen der vier Wirkstoffe bezüglich des Balzverhaltens von *L. heterotoma*-Männchen gegenüber mit Pheromonextrakt behandelten Filterpapierscheibchen. Dargestellt ist der Anteil reagierender Männchen (%) in Abhängigkeit der applizierten Wirkstoffdosen. Die Daten wurden mithilfe des [Online-Tools Quest Graph™ LD₅₀ Calculator](#) an eine Sigmoidalfunktion angepasst.

4.3.3 Effekte auf die Paarungshäufigkeit

In umfangreichen Vorversuchen zeigten bereits unbehandelte *L. heterotoma*-Paare eine Paarungshäufigkeit von unter 50%, sodass von diesem Versuch keine aussagekräftigen Ergebnisse zu erwarten waren. Daher wurden die Paarungsversuche mit behandelten *L. heterotoma* nicht durchgeführt.

4.3.4 Effekte auf die Wirtsfindung

Nach erfolgreicher Paarung suchen *L. heterotoma*-Weibchen die Wirtshabitate auf, um Wirts-larven zu parasitieren. Auch hierfür ist der Geruchssinn von entscheidender Bedeutung. Frühere Arbeiten hatten gezeigt, dass *L. heterotoma*-Weibchen in einem Olfaktometer den Geruch eines mit *D. melanogaster*-Larven besetzten *Drosophila*-Zuchtsubstrates bevorzugen [37]. Um zu untersuchen, ob die vier Wirkstoffe die Wirtsfindung von *L. heterotoma* beeinträchtigen, wurde wiederum das in Abschnitt 4.1.4 beschriebene T-Olfaktometer (senkrecht) verwendet. Die an dem Arm der Wirtszone angebrachten Eppendorf-Gefäße wurden mit ca. 1 ml *Drosophila*-Zuchtsubstrat bestückt, in dem sich mindestens 5 *Drosophila*-Larven befanden. Das Eppendorf-Gefäß der Kontrollzone blieb leer. Die Aufenthaltsdauern der mit unterschiedlichen Wirkstoffdosen oder Aceton (Kontrolle) behandelten *L. heterotoma*-Weibchen in der Wirts- bzw. Kontrollzone des Olfaktometers wurde für 5 min aufgenommen und mit dem Wilcoxon-Test für Paardifferenzen verglichen (n=30). Die Ergebnisse der Wirtsfindungsversuche sind in Abbildung 15 dargestellt. Mit Aceton behandelte *L. heterotoma*-Weibchen bevorzugten in allen Kontrollexperimenten den Wirtsgeruch. Das olfaktorische Orientierungsvermögen der Weibchen wurde jedoch durch alle getesteten subletalen Dosen von Dimethoat und Flupyradifuron gestört. Sulfoxaflor hatte nur bei der höchsten Testdosis einen Effekt, während Acetamidrid in den getesteten Dosen keinen signifikanten Einfluss auf die olfaktorische Wirtsfindung hatte.

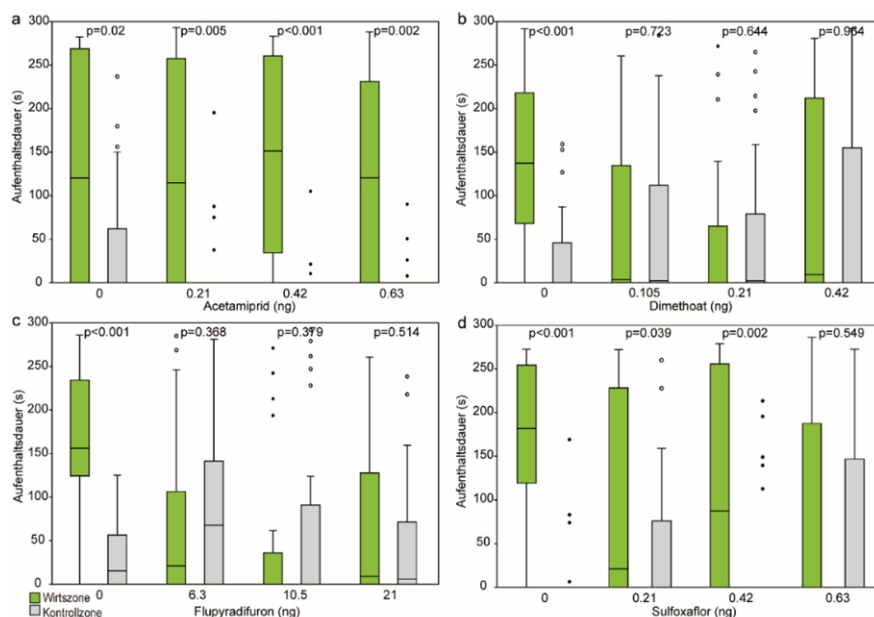


Abbildung 15: Resultate der Wirtsfindungsversuche mit *Leptopilina heterotoma*. Dargestellt ist die Zeit, die mit verschiedenen Dosen der Wirkstoffe (a) Acetamidrid, (b) Dimethoat, (c) Flupyradifuron, (d) Sulfoxaflor oder mit reinem

Aceton (0 ng) behandelte *Leptopilina heterotoma*-Weibchen in der Wirts- und der Kontrollzone des Olfaktometers verbracht haben. Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker) sowie Ausreißer (°: > 1,5 x Boxhöhe, *: >3 x Boxhöhe). P-Werte < 0.05 zeigen eine signifikante Präferenz der Weibchen für den Wirtsgeruch an (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen, n = 20).

4.3.5 Transfer der Wirkstoffe über die Nahrungskette

In diesem Versuch sollte exemplarisch untersucht werden, ob bioaktive, subletale Mengen von Pestiziden über den Wirt in *Leptopilina*-Wespen gelangen können und dann das Verhalten der Wespen beeinflussen. Hierzu wurde in einem Vorversuch zunächst die akute Toxizität von Dimethoat auf den Wirt *Drosophila melanogaster* untersucht. Hierzu wurden *Drosophila*-Zuchtröhrchen zunächst mit flüssigem Zuchtmedium (je 1,6 g Formula 4-24 Instant *Drosophila* Medium + 10 ml Wasser) bestückt. Zu diesem Nahrungsbrei wurden dann etwas Trockenhefe und 1 ml einer Dimethoat-Lösung (0,0001-10 mg/ml gelöst in 10% Aceton/Wasser) oder das reine Lösungsmittel (10% Aceton/Wasser, Kontrolle) hinzugefügt. Nach dem Erkalten wurden pro Gefäß 20 erwachsene *D. melanogaster* oder 20 *D. melanogaster* Larven (L1-L2) gesetzt (n=6). Nach 8 Tagen wurden dann die überlebenden Adulten bzw. die aus den Larven geschlüpften *D. melanogaster* ausgezählt. Die Überlebensdaten wurden wiederum mithilfe von Quest Graph™ LD₅₀ Calculator an eine Sigmoidalfunktion (Abbildung 16) angepasst, und es wurde die LC₅₀ berechnet (Adulte: 3 µg/ml, Larven: 1,6 µg/ml). Für die Versuche wurden die Konzentrationen 0 µg/ml (Kontrolle), 0,1 µg/ml (berechnete Überlebensrate der Larven: 93%), 0,5 µg/ml (90%) und 1,0 µg/ml (74%) verwendet. *Leptopilina heterotoma*-Weibchen, die sich in *Drosophila*-Larven der vier Behandlungen entwickelt hatten, wurden in dem Wirtsfindungsversuch, wie in Abschnitt 4.3.4 beschrieben, getestet.

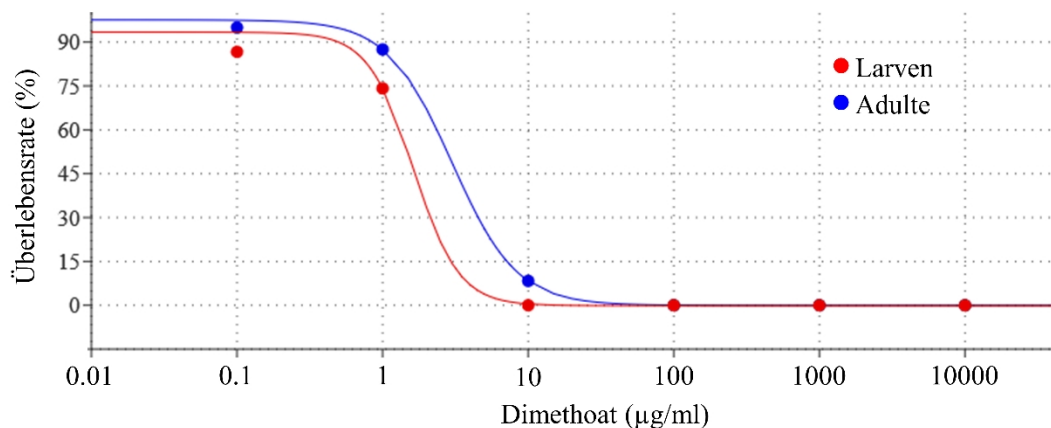


Abbildung 16: Dosis-Wirkungs-Kurven des Dimethoat für Larven und Adulte von *D. melanogaster* bei Gabe über das Nährmedium. Die Mortalität wurde 8 Tage nach der Applikation des Wirkstoffs bestimmt. Jeweils 1 ml einer Dimethoat-Lösung (in 10% Aceton/Wasser) wurde für einen Zuchtansatz (1,6 g Instant Nährmedium + 10 ml Wasser) verwendet (n = 6 Wiederholungen pro Dosis mit jeweils 20 Individuen).

Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abbildung 17 dargestellt. Die Behandlung des *Drosophila*-Nährmediums mit 0,1 und 0,5 µg/ml Dimethoat hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Reaktion von *L. heterotoma*-Weibchen auf den Wirtsgeruch. Weibchen, die sich jedoch in *Drosophila*-Larven entwickelt hatten, deren Nährmedium mit 1 µg/ml Dimethoat behandelt wurde, unterschieden nicht mehr zwischen dem Wirtsgeruch und der Kontrolle. Somit kann Dimethoat also über den Wirt in subletalen Dosen von *L. heterotoma* aufgenommen werden und dabei die olfaktorische Präferenz für den Wirtsgeruch unterbinden.

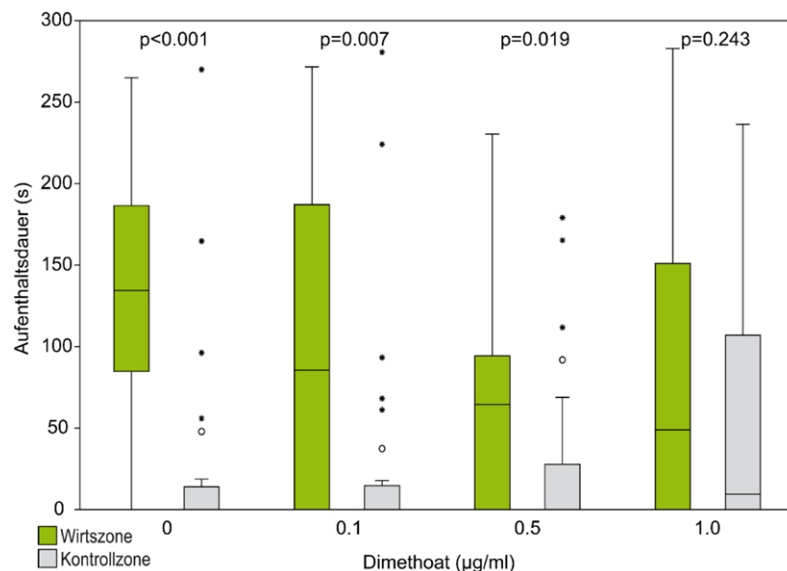


Abbildung 17: Resultate der Wirtsfindungsversuche mit *Leptopilina heterotoma* nach Aufnahme der Wirkstoffe über die Nahrungskette. Dargestellt ist die Zeit, die *L. heterotoma*-Weibchen in der Wirts- und der Kontrollzone des Olfaktometers verbrachten. Die Weibchen hatten sich in *Drosophila*-Larven entwickelt, deren Zuchtmedium mit subletalen Konzentrationen von Dimethoat behandelt worden war. Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker) sowie Ausreißer (°: > 1,5 x Boxhöhe, *: >3 x Boxhöhe). P-Werte < 0.05 zeigen eine signifikante Präferenz der Weibchen für den Wirtsgeruch an (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen, n = 20).

5 Diskussion

Die wichtigsten Ergebnisse des Teilprojektes sind in Abbildung 18 und Abbildung 19 noch einmal vergleichend zusammengefasst. Sie zeigen, dass subletale Dosen aller vier untersuchter Wirkstoffe bei mindestens einem der getesteten Modellorganismen die sexuelle Kommunikation und/oder die olfaktorische Wirtsfindung beeinträchtigten. Der olfaktorische Sinn ist für das Leben und den Fortpflanzungserfolg von Insekten von zentraler Wichtigkeit. Alle Wirkstoffe wirken als Rezeptorantagonisten (Acetamiprid, Flupyradifuron und Sulfoxaflor) oder Enzymhemmer (Dimethoat) auf cholinerge Neuronen, die u.a. an den synaptischen Übertragungen des Geruchssinns beteiligt sind [14]. Die Ergebnisse des Teilprojektes deuten somit darauf hin, dass subletale Dosen von Insektiziden, welche auf die cholinergen Neuronen von Insekten abzielen, den Geruchssinn parasitischer Wespen stören. Sollten parasitische Wespen solchen

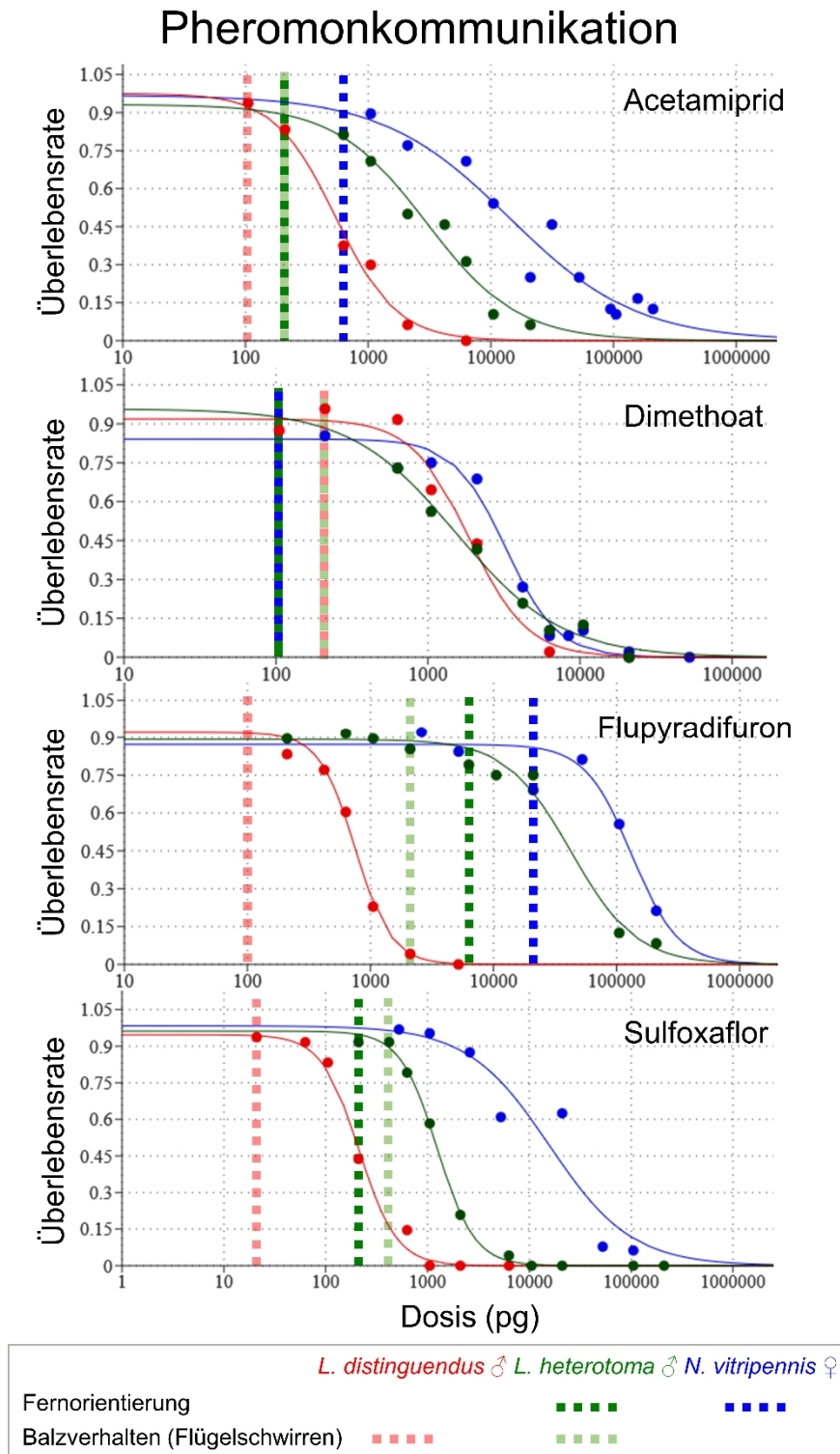


Abbildung 18: Zusammenhang zwischen akuter Toxizität und subletalen Effekten auf die Pheromonkommunikation. Dargestellt sind Dosis-Wirkungskurven (Überlebensrate) der vier Wirkstoffe bei den drei untersuchten Parasitoidenarten. Die jeweils geringste Dosis, bei der bei den drei Arten negative Effekte auf die Pheromonkommunikation auftraten (LOEL), sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

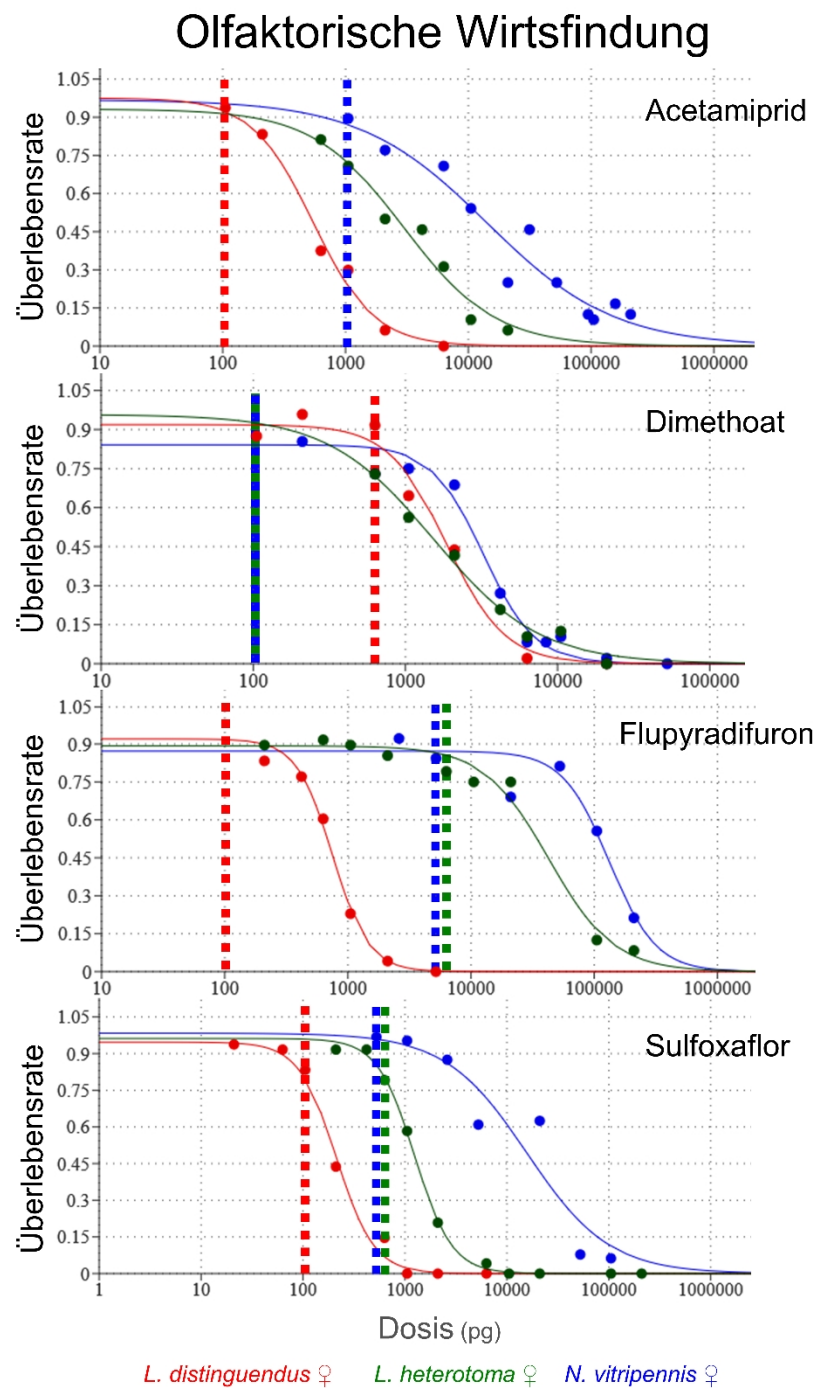


Abbildung 19: Zusammenhang zwischen akuter Toxizität und subletalen Effekten auf die olfaktorische Wirtsfindung. Dargestellt sind Dosis-Wirkungskurven (Überlebensrate) der vier Wirkstoffe bei den drei untersuchten Parasitoidenarten. Die jeweils geringste Dosis, bei der bei den drei Arten negative Effekte auf die olfaktorische Wirtsfindung auftraten, sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

Dosen unter natürlichen Bedingungen ausgesetzt sein, muss davon ausgegangen werden, dass dies ihre Funktion als natürliche Gegenspieler in terrestrischen Ökosystemen massiv beeinträchtigt, auch, wenn die hier bei *N. vitripennis* und *L. distinguendus* festgestellten direkten Effekte der Wirkstoffe auf die Nachkommenzahl eher moderat waren. Der olfaktorische Sinn parasitischer Wespen funktioniert prinzipiell wie bei anderen Insekten auch. Daher können ähnliche Effekte, wie sie in Teilprojekt 1 gefunden wurden, bei anderen Insekten nicht ausgeschlossen werden. Eine erfolgreiche Paarung und die Suche nach Nahrungsquellen sind entscheidend für den Reproduktionserfolg von Insekten. Somit liefert Teilprojekt 1 auch einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des in weiten Teilen der Welt zu beobachtenden Insektenrückgangs.

Entscheidend für die Relevanz der erzielten Ergebnisse ist die Frage, ob die in den Versuchen eingesetzten Dosen feldrelevant sind. Hier besteht weiterhin Forschungsbedarf, da die Aufnahmewege von Insektiziden bei Nichtzielorganismen noch nicht vollständig erforscht sind. In Teilprojekt 1 wurde für die Verabreichung der Wirkstoffe bewusst die topikale Applikation (als Acetonlösung) gewählt, da dadurch eine genaue Kontrolle der aufgenommenen Wirkstoffdosen möglich war. Die Aufnahme subletaler Dosen über die Kutikula oder die Tarsen ist auch ein möglicher Weg, wie Insektizide im Freiland in bioaktiven Mengen in parasitische Wespen gelangen können [9]. Vermutlich spielt jedoch die orale Aufnahme von kontaminierten pflanzlichen und tierischen Sekreten (floraler und extrafloraler Nektar, Honigtau, Guttationswasser) eine größere Rolle, da parasitische Wespen diese als Quelle für Kohlenhydrate und andere Nährstoffe verwenden [8, 10, 20, 22, 23]. Experimentell lassen sich bei oraler Verabreichung jedoch die aufgenommenen Wirkstoffmengen kaum kontrollieren, da weitgehend unbekannt ist, welche Volumina von diesen Flüssigkeiten von den oft sehr kleinen parasitischen Wespen unter natürlichen Bedingungen gefressen werden und ob die Anwesenheit von anthropogenen Kontaminanten das Fraßverhalten beeinflussen. Über die feldrelevanten Konzentrationen von Insektiziden in dem Nektar behandelter Pflanzen gibt es eine Reihe von Studien, jedoch ist die Datenlage für die relativ neuen Wirkstoffe Flupyradifuron und Sulfoxaflor noch recht schwach. In Tabelle 6 sind die Angaben einiger Studien zusammengefasst. Um einen ersten Überblick über die Fraßmengen zu erhalten, wurde in diesem Projekt eine Methode zur gaschromatographischen Zuckerbestimmung etabliert und ein Fraßexperiment mit *N. vitripennis* durchgeführt. Hierbei fraßen *N. vitripennis*-Weibchen binnen 24 Stunden ca. 2 µl einer 30%igen Glucoselösung. Legt man eine Fraßmenge von 2 µl für alle Modellorganismen sowie die höchsten Literaturangaben (Tabelle 6) für die vier Wirkstoffe zugrunde, so nähmen parasitische Wespen bereits Dosen auf, die nach unseren Ergebnissen bei mindestens einem der drei Modellsysteme subletale Effekte auslösen würden. Es muss zudem berücksichtigt werden, dass manche Wirkstoffe oral stärker wirken als topikal applizierte [39] und es Hinweise darauf gibt, dass zumindest Neonicotinoide kumulativ wirken können [40]. Somit könnte die mehrfache Aufnahme von sehr geringen Dosen letztlich doch zu messbaren subletalen Effekten führen. Zudem werden Insektizide oft in Kombination mit anderen Wirkstoffen (Fungizide, Herbizide) eingesetzt. Über die möglichen additiven oder synergistischen Effekte dieser Wirkstoffkombinationen bei Nichtzielorganismen ist jedoch noch viel zu wenig bekannt [39]. Guttationströpfchen von Pflanzen, die aus gebeiztem Saatgut gezogen wurden, können erhebliche Mengen an Insektiziden aufweisen (z.B. bis zu ca. 100 ng/µl Thiacloprid, 150 ng/µl Thiamethoxam und bis zu 200 ng/µl Imidacloprid) [23, 41], auch wenn für die hier getesteten Wirkstoffe diesbezüglich

Tabelle 6: Literaturangaben zu den Konzentrationen der hier untersuchten Wirkstoffe in floralem und extrafloralem Nektar behandelter Pflanzen. Die Angabe ng/2µl im Nektar entspricht bei einer angenommenen täglichen Fraßmenge von 2 µl (\cong 2 mg) der aufgenommenen Dosis in ng. In Spalte 3 wird die geringste Dosis der Substanzen angegeben, bei der bei mindestens einer der untersuchten Arten noch eine Wirkung auftrat (*lowest observed effect level*, LOEL).

Wirkstoff	Nektar (ng/2µl)	LOEL	Referenz
Acetamiprid	0,0001 - 0,0152	0,63	[42]
	0,14		[43]
	0,012		[44]
	0,02-0,36		[45]
	0,024 / 0,194 ^a		[46]
	bis 0,026		[47]
	bis 0,012		[48]
Flupyradifuron	0,52	2,63	[49, 50]
	8,0		[17]
	0,4-3 bis 31,8 ^a		[51]
	bis 0,004		[52]
Dimethoat	0,2 - 45,9	0,105	[42]
Sulfoxaflor	0,014 - 0,028	0,525	[53]
	0,01 - 0,094		[18]
	0,4		[54]
	0,06 – 2		[55]

^aextrafloraler Nektar

keine Literaturangaben vorliegen. Kürzlich wurde gezeigt, dass parasitische Wespen Guttationstropfen als Nahrungsquelle nutzen [24] und dass auch Guttationstropfen von Ackerwildkräutern systemische Pestizide in erheblichen Mengen enthalten können, wenn diese in der Nähe von behandelten Kulturpflanzen wachsen [56]. Honigtau, zuckerhaltige Ausscheidungen von Blattläusen und anderen Hemiptera, wird von parasitischen Wespen ebenfalls häufig als Kohlenhydratquelle verwendet und kann biologisch aktive Mengen von Insektiziden enthalten [57]. Aufgrund der Zulassung u.a. gegen Blattläuse, Weiße Fliegen und Thripse kann auch von Acetamiprid, Flupyradifuron und Sulfoxaflor vermutet werden, dass diese über Honigtau in Nutzinsekten gelangen und subletale Effekte auslösen, auch wenn bislang keine Daten zu Rückstandsmengen vorliegen [58].

Ein wichtiges Ergebnis von Teilprojekt 1 ist der Nachweis, dass bioaktive Dosen von Pestiziden auch über den Wirt in parasitische Wespen gelangen können. Bei einer Konzentration von Dimethoat im Nährmedium (1 µg/ml), bei der 75% der darin gezogenen *Drosophila*-Larven überlebten, waren *L. heterotoma*-Weibchen, die sich in diesen Larven entwickelt hatten, in ihrem Wirtsfindungsvermögen beeinträchtigt. Somit ist anzunehmen, dass der Wirkstofftransfer über den Wirt ebenfalls eine Rolle bei der Exposition von parasitischen Wespen gegenüber subletalen Insektizid-Dosen spielt.

6 Zusammenfassung

Parasitische Wespen spielen als natürliche Gegenspieler anderer Arthropoden eine wichtige Rolle in Ökosystemen. Über direkten Kontakt mit behandelten oder durch Verdriftung kontaminierten Pflanzen sowie durch die Aufnahme von kontaminiertem Nektar, Honigtau oder Guttationswasser können parasitische Wespen mit subletalen Dosen von Insektiziden in Kontakt kommen. Eigene Vorarbeiten mit dem Neonicotinoid Imidacloprid hatten bei dem Modellorganismus *Nasonia vitripennis* gezeigt, dass subletale Dosen dieses Wirkstoffs die Pheromonkommunikation und die olfaktorische Wirtsfindung massiv stören. Es ist jedoch nicht bekannt, ob auch andere Wirkstoffe, die wie die Neonicotinoide auf cholinerge Neuronen des Nervensystems von Insekten wirken, ähnliche Effekte haben und ob andere Arten parasitischer Wespen ähnliche Reaktionen zeigen. Teilprojekt 1 des Projektverbundes sollte bei drei Arten (*N. vitripennis*, *Lariophagus distinguendus* und *Leptopilina heterotoma*) die subletalen Effekte der Insektizide Acetamiprid (Neonicotinoid), Dimethoat (Organophosphorsäureester), Flupyradifuron (Butenolid) und Sulfoxaflor (Sulfoximin) untersuchen. Die Wespen wurden mit subletalen Dosen der vier Wirkstoffe behandelt, und danach wurde das pheromonvermittelte Paarungsverhalten und die olfaktorische Wirtsfindung in Biotests untersucht. Subletale Dosen aller vier Wirkstoffe störten bei mindestens einer der untersuchten Arten die Pheromonkommunikation und/oder die olfaktorische Wirtsfindung. Auch die Paarungshäufigkeit behandelter Tiere war signifikant verringert (*N. vitripennis* und *L. distinguendus*). Die direkten Effekte sublethaler Dosen der vier Wirkstoffe auf die Nachkommenzahl behandelter Weibchen waren hingegen nur moderat. Ein Transfer biologisch aktiver Wirkstoffmengen über die Nahrungskette (Zuchtmedium – *Drosophila*-Larven – Parasitoid) wurde am *Leptopilina*-Modellsystem mit dem Wirkstoff Dimethoat gezeigt. Insgesamt war die Stärke sublethaler Effekte wirkstoff- und artabhängig, wobei *L. distinguendus* generell am empfindlichsten reagierte. Die Ergebnisse des Teilprojektes deuten somit darauf hin, dass subletale Dosen von Insektiziden, welche auf die cholinergen Neuronen von Insekten abzielen, den Geruchssinn parasitischer Wespen beeinträchtigen. Der Geruchssinn ist von zentraler Wichtigkeit für die Ökosystemleistungen parasitischer Wespen. Es muss deshalb davon ausgegangen werden, dass subletale Effekte von Insektiziden die wichtige Funktion parasitischer Wespen als natürliche Feinde anderer Arthropoden negativ beeinflussen.

7 Ausblick

Die Ergebnisse von Teilprojekt 1 zeigen, dass subletale Dosen von Insektiziden den Geruchssinn von nützlichen Nichtzielorganismen massiv beeinträchtigen können. Aufgrund des konservierten olfaktorischen Systems von Insekten ist anzunehmen, dass die Ergebnisse auf andere Insekten übertragbar sind, was zukünftig durch weitere Studien mit Arten anderer Insektengilden zu belegen ist. Trotzdem liefert Teilprojekt 1 bereits jetzt einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des derzeitigen Insektenrückgangs.

Subletale Effekte auf Nichtzielorganismen sollten zukünftig im Rahmen von Zulassungsverfahren stärker berücksichtigt werden. Hierbei sollten neben Bestäubern wie der Honigbiene

verstärkt auch Modellorganismen anderer Insektengilden wie parasitische Wespen und Prädatoren untersucht werden. Die in Teilprojekt 1 entwickelten Modellsysteme und Biotestverfahren kommen hierfür prinzipiell in Frage.

Im Rahmen von Pflanzenschutzmaßnahmen werden oft mehrere Wirkstoffe verschiedener Wirkstoffklassen eingesetzt. Wichtige offene Fragen, die daher zukünftig untersucht werden sollten, betreffen mögliche additive und synergistische Effekte von mehreren Insektiziden oder von Insektiziden und Vertretern anderer Wirkstoffklassen (z.B. Herbizide, Fungizide).

Mögliche Expositionswege, über die Nichtzielorganismen unter Feldbedingungen mit subletalen Dosen von Pestiziden in Kontakt kommen, müssen zukünftig für eine realistischere Risikoabschätzung genauer untersucht werden.

8 Veröffentlichungen

Schöfer N, Ackermann J, Hoheneder J, Hofferberth J, Ruther J (2023) Sublethal effects of four insecticides targeting cholinergic neurons on partner and host finding in the parasitic wasp *Nasonia vitripennis*. *Environmental Toxicology and Chemistry* DOI: 10.1002/etc.5721.

Schöfer N, Ruther J (2023): Sublethal effects of insecticides on the chemical orientation of parasitic wasps. Internationale Entomologentagung 2023, Bozen, Südtirol/Italien, 20.-23.02. 2023, Posterpräsentation

Schöfer N, Ruther J (2022): Sublethal effects of insecticides on partner and host finding of *Lariophagus distinguendus*. 37th Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology, Kuala Lumpur, Malaysia, 08.-12.08. 2022, Posterpräsentation

Schöfer N, Ruther J (2021): Sublethal effects of insecticides on partner and host finding of *Nasonia vitripennis*. 36th Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology, Stellenbosch, Südafrika, 05.-10.10. 2021, Posterpräsentation

Literaturverzeichnis

[1] Hallmann, C.A., Sorg, M., Jongejans, E., Siepel, H., Hofland, N., Schwan, H., Stenmans, W., Müller, A., Sumser, H., Hörrén, T., et al. 2017 More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. *PLOS ONE* **12**, e0185809.

[2] Sánchez-Bayo, F. & Wyckhuys, K.A.G. 2019 Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biological Conservation* **232**, 8-27.

[3] Gill, R.J., Ramos-Rodriguez, O. & Raine, N.E. 2012 Combined pesticide exposure severely affects individual- and colony-level traits in bees. *Nature* **491**, 105-108.

[4] Henry, M., Beguin, M., Requier, F., Rollin, O., Odoux, J.F., Aupinel, P., Aptel, J., Tchamitchian, S. & Decourtye, A. 2012 A common pesticide decreases foraging success and survival in honey bees. *Science* **336**, 348-350.

[5] Fischer, J., Muller, T., Spatz, A.K., Greggers, U., Grunewald, B. & Menzel, R. 2014 Neonicotinoids interfere with specific components of navigation in honeybees. *Plos One* **9**, 10.

[6] Godfray, H.C.J., Blacquiere, T., Field, L.M., Hails, R.S., Petrokofsky, G., Potts, S.G., Raine, N.E., Vanbergen, A.J. & McLean, A.R. 2014 A restatement of the natural science evidence base concerning neonicotinoid insecticides and insect pollinators. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **281**, 9.

[7] Teder, T. & Knapp, M. 2019 Sublethal effects enhance detrimental impact of insecticides on non-target organisms: A quantitative synthesis in parasitoids. *Chemosphere* **214**, 371-378.

[8] Krischik, V.A., Landmark, A.L. & Heimpel, G.E. 2007 Soil-applied imidacloprid is translocated to nectar and kills nectar-feeding *Anagyrus pseudococci* (Girault) (Hymenoptera: Encyrtidae). *Environ. Entomol.* **36**, 1238-1245.

- [9] Prabhaker, N., Castle, S.J., Naranjo, S.E., Toscano, N.C. & Morse, J.G. 2011 Compatibility of two systemic neonicotinoids, imidacloprid and thiamethoxam, with various natural enemies of agricultural pests. *J Econ Entomol* **104**, 773-781.
- [10] Stapel, J.O., Cortesero, A.M. & Lewis, W.J. 2000 Disruptive sublethal effects of insecticides on biological control: Altered foraging ability and life span of a parasitoid after feeding on extrafloral nectar of cotton treated with systemic insecticides. *Biol. Contr.* **17**, 243-249.
- [11] Godfray, H.C.J. 1994 *Parasitoids*. 1. edn. Chichester, Princeton University Press, 473 p.
- [12] Tappert, L., Pokorny, T., Hofferberth, J. & Ruther, J. 2017 Sublethal doses of imidacloprid disrupt sexual communication and host finding in a parasitoid wasp. *Sci. Rep.* **7**, 42756.
- [13] Kremer, A.N. & King, B.H. 2019 A neonicotinoid affects the mating behavior of *Spalangia endius* (Hymenoptera: Pteromalidae), a biological control agent of filth flies. *Environ. Entomol.* **48**, 489-495.
- [14] Rabhi, K.K., Deisig, N., Demondion, E., Le Corre, J., Robert, G., Tricoire-Leignel, H., Lucas, P., Gadenne, C. & Anton, S. 2016 Low doses of a neonicotinoid insecticide modify pheromone response thresholds of central but not peripheral olfactory neurons in a pest insect. *Proc. R. Soc. B-Biol. Sci.* **283**, 7.
- [15] Siviter, H., Brown, M.J.F. & Leadbeater, E. 2018 Sulfoxaflor exposure reduces bumblebee reproductive success. *Nature* **561**, 109-112.
- [16] Cartereau, A., Pineau, X., Lebreton, J., Mathe-Allainmat, M., Taillebois, E. & Thany, S.H. 2022 Impairments in learning and memory performances associated with nicotinic receptor expression in the honeybee *Apis mellifera* after exposure to a sublethal dose of sulfoxaflor. *Plos One* **17**, e0272514.
- [17] Siviter, H. & Muth, F. 2022 Exposure to the novel insecticide flupyradifurone impairs bumblebee feeding motivation, learning, and memory retention. *Environmental Pollution* **307**, 119575.
- [18] Siviter, H., Scott, A., Pasquier, G., Pull, C.D., Brown, M.J.F. & Leadbeater, E. 2019 No evidence for negative impacts of acute sulfoxaflor exposure on bee olfactory conditioning or working memory. *PeerJ* **7**, 22.
- [19] Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Menach, K.L., Budzinski, H., Cluzeau, S. & Pham-Delègue, M.H. 2005 Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **48**, 242-250.
- [20] Schmolke, A., Kearns, B. & O'Neill, B. 2018 Plant guttation water as a potential route for pesticide exposure in honey bees: a review of recent literature. *Apidologie* **49**, 637-646.
- [21] Hrynko, I., Lozowicka, B. & Kaczynski, P. 2021 Development of precise micro analytical tool to identify potential insecticide hazards to bees in guttation fluid using LC-ESI-MS/MS. *Chemosphere* **263**, 128143.
- [22] Reetz, J.E., Schulz, W., Seitz, W., Spittler, M., Zuehlke, S., Armbruster, W. & Wallner, K. 2016 Uptake of Neonicotinoid Insecticides by Water-Foraging Honey Bees (Hymenoptera: Apidae) Through Guttation Fluid of Winter Oilseed Rape. *J Econ Entomol* **109**, 31-40.

- [23] Girolami, V., Mazzon, L., Squartini, A., Mori, N., Marzaro, M., Di Bernardo, A., Greatti, M., Giorio, C. & Tapparo, A. 2009 Translocation of neonicotinoid insecticides from coated seeds to seedling guttation drops: a novel way of intoxication for bees. *J Econ Entomol* **102**, 1808-1815.
- [24] Urbaneja-Bernat, P., Tena, A., González-Cabrera, J. & Rodríguez-Saona, C. 2020 Plant guttation provides nutrient-rich food for insects. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **287**, 20201080.
- [25] Werren, J.H. & Loehlin, D.W. 2009 The parasitoid wasp *Nasonia*: an emerging model system with haploid male genetics. *Cold Spring Harbor Protoc.*, pdb.emo134.
- [26] Ruther, J., Stahl, L.M., Steiner, S., Garbe, L.A. & Tolasch, T. 2007 A male sex pheromone in a parasitic wasp and control of the behavioral response by the female's mating status. *J. Exp. Biol.* **210**, 2163-2169.
- [27] Ruther, J., Steiner, S. & Garbe, L.A. 2008 4-methylquinazoline is a minor component of the male sex pheromone in *Nasonia vitripennis*. *J. Chem. Ecol.* **34**, 99-102.
- [28] Ruther, J., McCaw, J., Böcher, L., Pothmann, D. & Putz, I. 2014 Pheromone diversification and age-dependent behavioural plasticity decrease interspecific mating costs in *Nasonia*. *PLoS ONE* **9**, e89214.
- [29] Calabrese, E.J. 2013 Biphasic dose responses in biology, toxicology and medicine: Accounting for their generalizability and quantitative features. *Environmental Pollution* **182**, 452-460.
- [30] Niedermayer, S., Pollmann, M. & Steidle, J. 2016 *Lariophagus distinguendus* (Hymenoptera: Pteromalidae) (Förster) - past, present, and future: the history of a biological control method using *L. distinguendus* against different storage pests. *Insects* **7**, 39.
- [31] Ruther, J., Homann, M. & Steidle, J.L.M. 2000 Female-derived sex pheromone mediates courtship behaviour in the parasitoid *Lariophagus distinguendus*. *Entomol. Exp. Appl.* **96**, 265-274.
- [32] Steiner, S., Steidle, J.L.M. & Ruther, J. 2005 Female sex pheromone in immature insect males - a case of pre-emergence chemical mimicry? *Behav. Ecol. Sociobiol.* **58**, 111-120.
- [33] Kühbandner, S., Sperling, S., Mori, K. & Ruther, J. 2012 Deciphering the signature of cuticular lipids with contact sex pheromone function in a parasitic wasp. *J. Exp. Biol.* **215**, 2471-2478.
- [34] Steiner, S., Steidle, J.L.M. & Ruther, J. 2007 Host-associated kairomones used for habitat orientation in the parasitoid *Lariophagus distinguendus* (Hymenoptera: Pteromalidae). *J. St. Prod. Res.* **43**, 587-593.
- [35] Steidle, J.L.M. & Schöller, M. 1997 Olfactory host location and learning in the granary weevil parasitoid *Lariophagus distinguendus* (Hymenoptera: Pteromalidae). *J. Insect Behav.* **10**, 331-342.
- [36] Stökl, J., Hofferberth, J., Pritschet, M., Brummer, M. & Ruther, J. 2012 Stereoselective chemical defense in the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina heterotoma* is mediated by (-)-iridomyrmecin and (+)-isoiridomyrmecin. *J. Chem. Ecol.* **38**, 331-339.

- [37] Weiss, I., Roessler, T., Hofferberth, J., Brummer, M., Ruther, J. & Stökl, J. 2013 A nonspecific defensive compound evolves into a competition avoidance cue and a female sex pheromone. *Nat. Commun.* **4**, 2767.
- [38] Stelinski, L. & Tiwari, S. 2013 Vertical T-maze choice assay for arthropod response to odorants. *Jove-Journal of Visualized Experiments*, DOI: 10.3791/50229.
- [39] Tosi, S., Sfeir, C., Carnesecchi, E., vanEngelsdorp, D. & Chauzat, M.P. 2022 Lethal, sublethal, and combined effects of pesticides on bees: A meta-analysis and new risk assessment tools. *Science of the Total Environment* **844**, 156857.
- [40] van der Sluijs, J.P., Simon-Delso, N., Goulson, D., Maxim, L., Bonmatin, J.M. & Belzunces, L.P. 2013 Neonicotinoids, bee disorders and the sustainability of pollinator services. *Current Opinion in Environmental Sustainability* **5**, 293-305.
- [41] Mörtl, M., Takacs, E., Klatyik, S. & Szekacs, A. 2020 Appearance of thiacloprid in the guttation liquid of coated maize seeds. *Int. J. Environ. Res. Pub. He.* **17**, 14.
- [42] Zioga, E., Kelly, R., White, B. & Stout, J.C. 2020 Plant protection product residues in plant pollen and nectar: A review of current knowledge. *Environ. Res.* **189**, 16.
- [43] Heller, S., Joshi, N.K., Chen, J., Rajotte, E.G., Mullin, C. & Biddinger, D.J. 2020 Pollinator exposure to systemic insecticides and fungicides applied in the previous fall and pre-bloom period in apple orchards. *Environmental Pollution* **265**, 114589.
- [44] Azpiazu, C., Bosch, J., Vinuela, E., Medrzycki, P., Teper, D. & Sgolastra, F. 2019 Chronic oral exposure to field-realistic pesticide combinations via pollen and nectar: effects on feeding and thermal performance in a solitary bee. *Sci. Rep.* **9**, 11.
- [45] Capela, N., Xu, M., Simoes, S., Azevedo-Pereira, H., Peters, J. & Sousa, J.P. 2022 Exposure and risk assessment of acetamiprid in honey bee colonies under a real exposure scenario in Eucalyptus sp. landscapes. *Science of the Total Environment* **840**, 156485.
- [46] Zhou, H.X., Milne, R.I., Cui, P., Gu, W.J., Hu, M.F., Liu, X.Y., Song, Y.Q., Cao, J. & Zha, H.G. 2022 Comparing the contents, functions and neonicotinoid take-up between floral and extrafloral nectar within a single species (*Hemerocallis citrina* Baroni). *Ann Bot* **129**, 429-441.
- [47] Pohorecka, K., Skubida, P., Miszczak, A., Semkiw, P., Sikorski, P., Zagibajlo, K., Teper, D., Koltowski, Z., Skubida, M., Zdanska, D., et al. 2012 Residues of neonicotinoid insecticides in bee collected plant material from oilseed rape crops and their effect on bee colonies. *Journal of Apicultural Science* **56**, 115-134.
- [48] Demares, F.J., Schmehl, D., Bloomquist, J.R., Cabrera, A.R., Huang, Z.Y., Lau, P., Rangel, J., Sullivan, J., Xie, X.B. & Ellis, J.D. 2022 Honey bee (*Apis mellifera*) exposure to pesticide residues in nectar and pollen in urban and suburban environments from four regions of the United States. *Environ Toxicol Chem* **41**, 991-1003.
- [49] Siviter, H. & Muth, F. 2020 Do novel insecticides pose a threat to beneficial insects? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **287**, 20201265.
- [50] Campbell, J.W., Cabrera, A.R., Stanley-Stahr, C. & Ellis, J.D. 2016 An evaluation of the honey bee (Hymenoptera: Apidae) safety profile of a new systemic insecticide, flupyradifurone, under field conditions in Florida. *J Econ Entomol* **109**, 1967-1972.

- [51] EPA. 2015 Environmental fate and ecological risk assessment for foliar, soil drench, and seed treatment uses of the new insecticide flupyradifurone (BYI 02960). *Washington, DC: Environmental Protection Agency*.
- [52] Bishop, C.A., Woundneh, M.B., Maisonneuve, F., Common, J., Elliott, J.E. & Moran, A.J. 2020 Determination of neonicotinoids and butenolide residues in avian and insect pollinators and their ambient environment in Western Canada (2017, 2018). *Science of the Total Environment* **737**, 139386.
- [53] Jiang, H., Chen, J.J., Zhao, C., Tian, Y.Q., Zhang, Z.X. & Xu, H.H. 2020 Sulfoxaflor Residues in Pollen and Nectar of Cotton Applied through Drip Irrigation and Their Potential Exposure to *Apis mellifera* L. *Insects* **11**, 11.
- [54] Zhou, H.X., Chen, M.H., Gu, W.J., Hu, M.F., Liu, X.Y., Zhou, J., Song, Y.Q. & Zha, H.G. 2022 Identification and quantitation of the novel insecticide sulfoxaflor and its metabolites in floral nectar from *Salvia splendens* Ker Gawl. (Lamiaceae). *Ecotoxicology* **31**, 1310-1320.
- [55] EPA. 2016 Addendum for the proposed section 3 registration of Transform™ WG and Closer™ SC (Sulfoxaflor) for use on various crops, turf, and ornaments. . *Washington, DC: Environmental Protection Agency*.
- [56] Mörtl, M., Darvas, B., Vehovszky, Á., Györi, J. & Székács, A. 2019 Contamination of the guttation liquid of two common weeds with neonicotinoids from coated maize seeds planted in close proximity. *Science of The Total Environment* **649**, 1137-1143.
- [57] Calvo-Agudo, M., Gonzalez-Cabrera, J., Pico, Y., Calatayud-Vernich, P., Urbaneja, A., Dicke, M. & Tena, A. 2019 Neonicotinoids in excretion product of phloem-feeding insects kill beneficial insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **116**, 16817-16822.
- [58] Calvo-Agudo, M., Tooker, J.F., Dicke, M. & Tena, A. 2022 Insecticide-contaminated honeydew: risks for beneficial insects. *Biol. Rev.* **97**, 664-678.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Strukturformeln der vier untersuchten Wirkstoffe. a) Acetamidrid, b) Dimethoat, c) Flupyradifuron, d) Sulfoxaflor	5
Abbildung 2:	Dosis-Wirkungs-Kurven der Wirkstoffe Acetamidrid, Dimethoat, Flupyradifuron und Sulfoxaflor bei <i>N. vitripennis</i> . Die Mortalität wurde 72 Stunden nach der Applikation verschiedener Wirkstoffdosen (gelöst in 210 nl Aceton) bestimmt (n = 6 Wiederholungen pro Dosis mit jeweils 8 Individuen).....	7
Abbildung 3:	Resultate der Pheromonversuche. Dargestellt ist die Zeit, die mit verschiedenen Dosen der Wirkstoffe (a) Acetamidrid, (b) Dimethoat, (c) Flupyradifuron, (d) Sulfoxaflor oder jeweils mit reinem Aceton (0 ng) behandelte <i>Nasonia vitripennis</i> -Weibchen in der Pheromon- und der Kontrollzone des Olfaktometers verbrachten. Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker) sowie Ausreißer (°: > 1,5 x Boxhöhe, *: >3 x Boxhöhe). P-Werte < 0.05 zeigen eine signifikante Präferenz der Weibchen für das männliche Sexualpheromon an (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen, n = 20).....	8
Abbildung 4:	Paarungshäufigkeit von <i>N. vitripennis</i> -Paaren, bei denen das Männchen, das Weibchen oder beide Partner mit verschiedenen Dosen (Werte in den Säulen in ng) von Acetamidrid, Dimethoat, Flupyradifuron oder Sulfoxaflor behandelt wurden. Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle (0 ng) (* P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001, Fisher's Exact Test, n=20).....	9
Abbildung 5:	Resultate der Wirtsfindungsversuche mit <i>N. vitripennis</i> . Dargestellt ist die Zeit, die mit verschiedenen Dosen der Wirkstoffe (a) Acetamidrid, (b) Dimethoat, (c) Flupyradifuron, (d) Sulfoxaflor oder mit reinem Aceton (0 ng) behandelte <i>Nasonia vitripennis</i> -Weibchen in der Wirts- und der Kontrollzone des Olfaktometers verbracht haben. Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker) sowie Ausreißer (°: > 1,5 x Boxhöhe, *: >3 x Boxhöhe). P-Werte < 0.05 zeigen eine signifikante Präferenz bzw. Meidung (a, b) des Wirtsgeruches durch die Weibchen an (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen, n = 20).....	10
Abbildung 6:	Dosis-Wirkungs-Kurven der Wirkstoffe Acetamidrid, Dimethoat, Flupyradifuron und Sulfoxaflor für <i>L. distinguendus</i> . Die Mortalität wurde 72 Stunden nach der Applikation verschiedener Wirkstoffdosen (gelöst in 210 nl Aceton) bestimmt (n = 6 Wiederholungen pro Dosis mit jeweils 8 Individuen).....	12

- Abbildung 7: Resultate der der Pheromonversuche mit *L. distinguendus*. Anzahl der Flügelschirrserien (wing fanning), die mit verschiedenen Dosen der Wirkstoffe (a) Acetamiprid, (b) Dimethoat, (c) Flupyradifuron, (d) Sulfoxaflor oder jeweils mit reinem Aceton (0 ng) behandelte *L. distinguendus*-Männchen gegenüber einem toten Weibchen (*Dummy*) zeigten. Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker) sowie Ausreißer ($^{\circ}$: $> 1,5 \times$ Boxhöhe, $*$: $> 3 \times$ Boxhöhe). P-Werte $< 0,05$ zeigen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle an, Kruskal-Wallis Test und Dunn's-Test für Einzelvergleiche, $n = 20$). 13
- Abbildung 8: Paarungshäufigkeit von *L. distinguendus*-Paaren, bei denen das Männchen, das Weibchen oder beide Partner mit verschiedenen Dosen (Werte in den Säulen in ng) von Acetamiprid, Dimethoat, Flupyradifuron oder Sulfoxaflor behandelt wurden. Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle (0 ng) ($*$ $P < 0,05$, $**$ $P < 0,01$, $***$ $P < 0,001$, Fisher's Exact Test, $n=20$). 14
- Abbildung 9: Resultate der Wirtsfindungsversuche mit *L. distinguendus*. Dargestellt ist die Zeit, die mit verschiedenen Dosen der Wirkstoffe (a) Acetamiprid, (b) Dimethoat, (c) Flupyradifuron, (d) Sulfoxaflor oder jeweils mit reinem Aceton (0 ng) behandelte *L. distinguendus*-Weibchen in der Wirts- und der Kontrollzone des Olfaktometers verbracht haben. Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker) sowie Ausreißer ($^{\circ}$: $> 1,5 \times$ Boxhöhe, $*$: $> 3 \times$ Boxhöhe). P-Werte $< 0,05$ zeigen eine signifikante Präferenz der Weibchen für den Geruch des Larvalkots von Kornkäfern (*Sitophilus granarius*) an (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen, $n = 20$). 16
- Abbildung 10: Dosis-Wirkungs-Kurven der Wirkstoffe Acetamiprid, Dimethoat, Flupyradifuron und Sulfoxaflor für *L. heterotoma*. Die Mortalität wurde 72 Stunden nach der Applikation verschiedener Wirkstoffdosen (gelöst in 210 nl Aceton) bestimmt ($n = 6$ Wiederholungen pro Dosis mit jeweils 8 Individuen). 18
- Abbildung 11: Resultate der Pheromonversuche (Fernorientierung) mit *L. heterotoma*. Dargestellt ist die Zeit, die mit verschiedenen Dosen der Wirkstoffe (a) Acetamiprid, (b) Dimethoat, (c) Flupyradifuron oder (d) Sulfoxaflor sowie mit reinem Aceton (0 ng) behandelte *L. heterotoma*-Männchen in der Pheromon- und der Kontrollzone des Olfaktometers verbracht haben. Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker) sowie Ausreißer ($^{\circ}$: $> 1,5 \times$ Boxhöhe, $*$: $> 3 \times$ Boxhöhe). P-Werte $< 0,05$ zeigen eine signifikante Präferenz der Männchen für eine der beiden Zonen an (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen, $n = 20$). 19
- Abbildung 12: Resultate der der Pheromonversuche (Balzverhalten im Nahbereich) mit *L. heterotoma*. Dauer des Flügelschirrens (wing fanning), die mit verschiedenen Dosen der Wirkstoffe (a) Acetamiprid, (b) Dimethoat, (c)

- Flupyradifuron oder (d) Sulfoxaflor sowie mit reinem Aceton (0 ng) behandelte *L. heterotoma*-Männchen gegenüber einem Pheromonextrakt zeigten. Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker) sowie Ausreißer (°: > 1,5 x Boxhöhe, *: >3 x Boxhöhe). P-Werte <0,05 zeigen einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle an, Kruskal-Wallis Test und Dunn's-Test für Einzelvergleiche, n = 20). 20
- Abbildung 13: Resultate der Pheromonversuche (Balzverhalten im Nahbereich) mit *L. heterotoma*. Anteil der Männchen, die auf den Weibchenextrakt mit Flügelschwirren (wing fanning) reagierten. Männchen wurden mit verschiedenen Dosen der Wirkstoffe (a) Acetamiprid, (b) Dimethoat, (c) Flupyradifuron oder (d) Sulfoxaflor sowie mit reinem Aceton (0 ng) behandelt. Mit Sternchen gekennzeichnete Säulen unterscheiden sich signifikant von der jeweiligen Kontrolle (*P<0,05; **P<0,01, ***P<0,001, Fisher's Exact Test, n = 20). 21
- Abbildung 14: Dosis-Wirkungsbeziehungen der vier Wirkstoffe bezüglich des Balzverhaltens von *L. heterotoma*-Männchen gegenüber mit Pheromonextrakt behandelten Filterpapierscheibchen. Dargestellt ist der Anteil reagierender Männchen (%) in Abhängigkeit der applizierten Wirkstoffdosen. Die Daten wurden mithilfe des Online-Tools Quest Graph™ LD₅₀ Calculator an eine Sigmoidalfunktion angepasst. 21
- Abbildung 15: Resultate der Wirtsfindungsversuche mit *Leptopilina heterotoma*. Dargestellt ist die Zeit, die mit verschiedenen Dosen der Wirkstoffe (a) Acetamiprid, (b) Dimethoat, (c) Flupyradifuron, (d) Sulfoxaflor oder mit reinem Aceton (0 ng) behandelte *Leptopilina heterotoma*-Weibchen in der Wirts- und der Kontrollzone des Olfaktometers verbracht haben. Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und Maximalwerte (Whisker) sowie Ausreißer (°: > 1,5 x Boxhöhe, *: >3 x Boxhöhe). P-Werte < 0.05 zeigen eine signifikante Präferenz der Weibchen für den Wirtsgeruch an (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen, n = 20). 22
- Abbildung 16: Dosis-Wirkungs-Kurven des Dimethoat für Larven und Adulte von *D. melanogaster* bei Gabe über das Nährmedium. Die Mortalität wurde 8 Tage nach der Applikation des Wirkstoffs bestimmt. Jeweils 1 ml einer Dimethoat-Lösung (in 10% Aceton/Wasser) wurde für einen Zuchtansatz (1,6 g Instant Nährmedium + 10 ml Wasser) verwendet (n = 6 Wiederholungen pro Dosis mit jeweils 20 Individuen). 23
- Abbildung 17: Resultate der Wirtsfindungsversuche mit *Leptopilina heterotoma* nach Aufnahme der Wirkstoffe über die Nahrungskette. Dargestellt ist die Zeit, die *L. heterotoma*-Weibchen in der Wirts- und der Kontrollzone des Olfaktometers verbrachten. Die Weibchen hatten sich in *Drosophila*-Larven entwickelt, deren Zuchtmedium mit subletalen Konzentrationen von Dimethoat behandelt worden war. Box-and-Whisker Plots zeigen den Median (horizontale Linie), 25-75% Quartile (Box), Minimal- und

Maximalwerte (Whisker) sowie Ausreißer (°: > 1,5 x Boxhöhe, *: >3 x Boxhöhe). P-Werte < 0.05 zeigen eine signifikante Präferenz der Weibchen für den Wirtsgeruch an (Wilcoxon-Test für Paardifferenzen, n = 20). 24

Abbildung 18: Zusammenhang zwischen akuter Toxizität und subletalen Effekten auf die Pheromonkommunikation. Dargestellt sind Dosis-Wirkungskurven (Überlebensrate) der vier Wirkstoffe bei den drei untersuchten Parasitoidenarten. Die jeweils geringste Dosis (LOEL), bei der bei den drei Arten negative Effekte auf die Pheromonkommunikation auftraten, sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. 25

Abbildung 19: Zusammenhang zwischen akuter Toxizität und subletalen Effekten auf die olfaktorische Wirtsfindung. Dargestellt sind Dosis-Wirkungskurven (Überlebensrate) der vier Wirkstoffe bei den drei untersuchten Parasitoidenarten. Die jeweils geringste Dosis, bei der bei den drei Arten negative Effekte auf die olfaktorische Wirtsfindung auftraten, sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. 26