

Institut für Phytopathologie
der Karl-Marx-Universität Leipzig
Leipzig

W. KÜHNE

Eine Methode zur radioaktiven Massenmarkierung von *Meligethes spec.* mit $^{32}\text{P}^1$

Die Verwendung radioaktiver Isotope zur Klärung entomologischer Fragen hat auf Grund der vielfältigen Eignung und der zahlreich vorhandenen Untersuchungsmöglichkeiten in den letzten 15 Jahren sprunghaft zugenommen. Auch die Tatsache, daß bei derartigen Versuchen in relativ kurzer Zeit eine größere Anzahl aussagekräftiger Werte zur Verfügung stehen, dürfte zu dieser Entwicklung beigetragen haben.

Für den Einsatz radioaktiver Isotope in der angewandten Entomologie bestehen grundsätzlich zwei Möglichkeiten: Einmal können radioaktive Substanzen als Leitisotope zu verschiedenen Markierungszwecken Verwendung finden, andererseits sind sie auch als Strahlenquelle zur Erzielung von Sterilität oder Mortalität geeignet. Von diesen Möglichkeiten hat die Markierungstechnik der Insekten besonders im Rahmen ökologischer und populationsdynamischer Studien eine zunehmende Bedeutung erlangt. Dies bezieht sich im einzelnen vorwiegend auf Untersuchungen, wie der Verhaltensweisen, der Migrationswege, der Verbreitungsareale sowie bestimmter Lebensrhythmen. Auch die Beziehungen zwischen Insekt und Wirtspflanze, die Übertragung von Krankheiten, verschiedene physiologische und toxikologische Probleme sowie Resistenzerscheinungen und Parasitierungsverhältnisse sind hierfür geeignete Untersuchungsobjekte.

In den Jahren 1962—1965 wurden am Institut für Phytopathologie in Leipzig Untersuchungen über die Ausbreitung und Verteilung der wichtigsten Rapschädlinge innerhalb großflächiger Bestände unter besonderer Berücksichtigung von Feldrand und Feldmitte durchgeführt. Angeregt durch einige Arbeiten, vorwiegend amerikanischer und sowjetischer Autoren, drängte sich der Gedanke auf, im Rahmen der Beantwortung dieser Versuchsfrage auch radioaktiv markierte Insekten zu verwenden. Für die Verwirklichung dieses Vorhabens war zunächst die Berücksichtigung folgender Tatsache erforderlich: Eine Aussage über die Ausbreitung bzw. den Flugverlauf markierter Insekten ist nur möglich, wenn es gelingt, sie entweder direkt im Bestand mit einem transportablen Zählgerät zu verfolgen oder durch eine entsprechende Fangmethode einen möglichst hohen Anteil der ausgesetzten Tiere zurückzugewinnen. Da aber im Freiland eine Verbreitung nach allen Richtungen gegeben ist, kann im Bestand vielfach nur eine geringe Dichte vorliegen. Dadurch, und zum Teil auch

¹ Nach einem Vortrag auf der Tagung über Probleme der Phytopathologie und der angewandten Entomologie des Instituts für Phytopathologie Aschersleben der DAL zu Berlin vom 24. — 25. Juni 1965.

bedingt durch die Eigenart der Fangmethode, werden in den wenigsten Fällen mehr als 10% der markierten Insekten wiedererfaßt. Deshalb sollten für derartige Freilandversuche nur solche Insekten Verwendung finden, die kurzfristig in größeren Mengen durch Zuchtmethoden oder Freilandfänge zu beschaffen sind. Unter den Rapsschädlingen eignete sich besonders *Meligethes spec.* Hierfür war die bekannte Erscheinung ausschlaggebend, daß sich der Rapsglanzkäfer ausschließlich in den Knospenständen aufhält und deshalb, vor allem nach erfolgter Massenbesiedlung, durch Kescherfänge in größeren Mengen zu beschaffen ist. Auf diese Art können an einem Nachmittag von fünf Personen ca. eine Million Käfer gefangen werden.

Für die Verabfolgung radioaktiver Isotope war es nun erforderlich, eine Methode zu erarbeiten, die kurzfristig die Markierung einer größeren Anzahl von *Meligethes spec.* gestattet. Obwohl dazu verschiedene Möglichkeiten bestehen, hat sich in der Vergangenheit, besonders für den Zweck der Massenmarkierung, in zunehmendem Maße die Verabreichung radioaktiver Nahrungsmittel bewährt (JENKINS, 1962). Die Anwendung dieser Methode für den Rapsglanzkäfer setzte zunächst einige Studien über die Aufnahme von Fraßstoffen voraus. Dabei konnte unter einem Binokular neben Pollenkörnern, die im Februar 1964 einer Bienenwabe entnommen wurden, auch der Verzehr von 3- und 5%iger Honig- und Zuckerlösung beobachtet werden. Diese Feststellung brachte uns unter gleichzeitiger Berücksichtigung der Tatsache, daß die Käfer auf der Oberfläche von derartigen Lösungen zu schwimmen vermögen, den grundsätzlichen Hinweis auf die Art und die Form des zu verwendenden Nährmediums.

Um dem gefundenen Substrat eine radioaktive Eigenschaft verleihen zu können, war zunächst die Auswahl eines entsprechenden Isotopes erforderlich. Für die Eignung im biologischen Versuch sind besonders der Emissionstyp, die Strahlungsenergie, die Halbwertszeit, die biologische Akkumulation und Speicherung im Insekt und die biologische Toxizität als entscheidende Kriterien anzusehen. Nach JENKINS (1962) sind für entomologische Untersuchungen bisher 43 verschiedene Radioisotope zum Einsatz gekommen. Für die Insektenmarkierung wurde davon auf Grund besonders günstiger Eigenschaften vorwiegend radioaktiver Phosphor verwendet. ^{32}P gehört entsprechend der Art der ausgeschleuderten Teilchen zu den Betastrahlern. Bei der Emission wird eine relativ hohe Zerfallsenergie von 1,7 MeV frei. Deshalb kann er im jeweiligen Versuchsobjekt auch meßtechnisch deutlich nachgewiesen werden. Da die gegenwärtigen Zählgeräte eine hohe Empfindlichkeit aufweisen, genügen in zahlreichen Fällen bereits relativ geringe Dosen. Die Halbwertszeit, die besonders im Zusammenhang mit der Versuchsdauer von Bedeutung ist, beträgt 14,3 Tage und hat sich bereits für verschiedene Untersuchungen als geeignet erwiesen. Dieser verhältnismäßig rasche radioaktive Zerfall kommt gleichzeitig einer schnellen Beseitigung der Strahlenquellen nach Beendigung von Freilandversuchen entgegen. Für eine bevorzugte Verwendung muß ferner das Verhalten im biologischen Objekt angesehen werden. Phosphor kommt in allen tierischen und pflanzlichen Zellen vor, wird leicht und gleichmäßig durch das Gewebe auf-

genommen und schließlich auch festgehalten und gespeichert. Nach QUEDNAU (1960) kann die Toxizität im Stoffwechsel nach Übergang der radioaktiven Phosphate in stabile Sulfate als unbedeutend bezeichnet werden. Auch beim Umgang mit diesem Isotop sind hinsichtlich der radiologischen Toxizität im Vergleich zu einem Gammastrahler, wie z. B. bei ^{60}Co , weitaus geringere Vorsichtsmaßnahmen erforderlich.

Auf Grund der aufgeführten Eigenschaften wurde ^{32}P auch für die Markierung von *Meligethes spec.* ausgewählt. Die praktischen Arbeiten hierzu begannen im Jahre 1964. Zunächst wurde an einem Nachmittag eine größere Anzahl Rapsglanzkäfer durch Kescherfänge beschafft. Noch am gleichen Abend erfolgte die Aufbewahrung der Käfer in kleinen, mit Gaze verschlossenen Blattlauschälchen. Am anderen Morgen wurde versucht, über das Gewicht die ungefähre Anzahl zu ermitteln. Da ein Käfer im Durchschnitt 1,2 mg wog, standen dem Gesamtgewicht nach ca. 120 000 Rapsglanzkäfer zur Verfügung. Als Markierungsgefäße wurden ERLÉNMEYER-Kolben (1000 ml) mit Glasstopfen ausgewählt. Um eine möglichst große Flüssigkeitsoberfläche als Schwimmbereich für die Käfer zu erhalten, wurde jedes dieser Gefäße nur mit 150 ml 3%iger Zuckerlösung gefüllt. Anschließend erfolgte die Zugabe trägerfreier Phosphorsäure in Form von wässriger Natrium-Dihydrogen-Phosphat-Lösung ($\text{NaH}_2^{32}\text{PO}_4$). Die Aktivität der Markierungsflüssigkeit betrug 10 Millicurie. Dieser radioaktiven Zuckerlösung wurden dann jeweils soviel Käfer hinzugesetzt, bis die Flüssigkeitsoberfläche damit nahezu bedeckt war. Jeder ERLÉNMEYER-Kolben enthielt ca. 5000—6000 Individuen. Die Zugabe einer größeren Anzahl hat sich als ungünstig erwiesen, da bei nicht ausreichender Flüssigkeitsoberfläche die Käfer übereinander zu liegen kommen und dadurch die untersten in der Lösung ertrinken.

Zur Orientierung über die Aufnahme der radioaktiven Flüssigkeit wurden in Abständen von 30 Minuten Proben entnommen und nach äußerlichem Abspülen mit Wasser unter dem Zählrohr die abgegebenen Impulse ermittelt. Da in einem Nebenversuch eine ausreichende Markierung bereits toter Käfer nicht gelang, wurde die Vermutung bestärkt, daß der weitaus größte Teil der Impulsabgabe nicht auf äußerliche Anhaftung, sondern auf eine aktive, an die Lebenstätigkeit gebundene Aufnahme der radioaktiven Zuckerlösung zurückzuführen ist. Bereits nach zwei Stunden waren die meisten Käfer entsprechend dem Versuchszweck ausreichend markiert. Sie gaben im GEIGERZähler zwischen 800 und 1200 Impulse pro Minute ab. Deshalb erfolgte nach dieser Zeit über ein gut durchlässiges Tuch in einem hochwandigen Trichter die Trennung der Käfer von der radioaktiven Flüssigkeit. Anschließend wurde mit Wasser nachgespült und das Tuch mit den Insekten für den Transport in einem verschlußsicheren Glasgefäß untergebracht. Nach der Ausbreitung des Tuches am Freilassungsort waren innerhalb weniger Minuten nahezu alle Käfer abgeflogen. Für die Wiedererfassung der ausgesetzten Käfer wurden an den drei nachfolgenden Tagen im Bestand nach einem bestimmten System Kescherungen durchgeführt. Nach vorheriger Abtötung der Fänge mit Äther war mittels des GEIGERZählers sehr

schnell und ohne Schwierigkeiten der Anteil markierter Käfer herauszufinden. Gleichzeitig ergab sich dabei die Feststellung, daß, bedingt durch einen gewissen Nulleffekt, für eine einwandfreie Identifizierung eine Mindestimpulsabgabe von 150 je Individuum erforderlich ist.

Über die Verteilung von ^{32}P in den Organen des Rapsglanzkäfers wurden vorerst keine Untersuchungen durchgeführt. Nach JOTTES (1963) besteht die Möglichkeit, derartige Fragen mit Hilfe der Autoradiographie zu beantworten. Einige Autoren berichteten über eine bevorzugte Speicherung verschiedener Isotope bei Wespen im Darmepithel und bei Fruchtfliegenlarven in den Malpighischen Gefäßen (BOWEN, 1950; BOWEN et al., 1951). Von CRAIG & OLSEN (1951) und von QUEDNAU (1960) konnte auch der Übergang der Aktivität von markierten Insekten auf die abgelegten Eier und die Nachkommenschaft nachgewiesen werden.

Eine Beeinträchtigung der Lebenstätigkeit durch die Markierung mit ^{32}P war in Übereinstimmung mit den Mitteilungen von QUEDNAU (1960) an Schlupfwespen, von HAY & MYSER (1961) an Zikaden und von QURAIISHI et. al. (1963) an einer *Anopheles*-Art nicht festzustellen. Dazu ist zu bemerken, daß ganz allgemein Insekten gegenüber ionisierender Strahlung eine weitaus geringere Empfindlichkeit aufweisen als höher entwickelte Lebewesen. Darüber hinaus finden für Markierungszwecke im Vergleich zur Letal-Dosis, die nach ANDREJEW (1958) bei Insekten 40000 bis 100000 r beträgt, nur sehr gering bemessene Dosen Verwendung.

Über die Verteilung der markierten und ausgesetzten Rapsglanzkäfer innerhalb des Bestandes kann an dieser Stelle nicht berichtet werden, da die begonnenen Freilandversuche hinsichtlich der Vollständigkeit und Sicherheit der Ergebnisse einer Fortsetzung in größerem Ausmaß bedürfen.

Zusammenfassung

Es wurde eine Methode erarbeitet, die kurzfristig die Markierung einer größeren Anzahl von *Meligethes spec.* mit ^{32}P gestattet. Dazu fanden ERLÉNMEYER-Kolben (1000 ml) mit je 150 ml 3%iger Zuckerlösung Verwendung. Als Markierungssubstanz wurde trägerfreie Phosphorsäure in Form von wäßriger $\text{NaH}_2^{32}\text{PO}_4$ -Lösung zugegeben. Die Aktivität der Markierungsflüssigkeit betrug 10 Millicurie. Bereits nach zwei Stunden waren die meisten Rapsglanzkäfer entsprechend dem Versuchszweck ausreichend markiert. Eine Beeinträchtigung der Lebens- bzw. Flugtätigkeit der Tiere konnte nicht festgestellt werden.

Summary

A method was developed by which a considerable number of *Meligethes spec.* can be marked with ^{32}P in a short time. We used ERLÉNMEYER flasks (1000 ml) with 150 ml of a three per cent sugar solution in each. Carrier-free phosphoric acid, in the form of a hydrous $\text{NaH}_2^{32}\text{PO}_4$ solution, was added as tracer liquid. The activity of the tracer liquid was 10 millicurie. Only two hours later most of the *Meligethes* were sufficiently marked for the purposes of the tests. No impairment of their body functions or their flying activities was observed.

Резюме

Разрабатывался метод, который позволяет в короткое время маркировать большое количество *Meligethes* спес. с ^{32}P . Для этого имелись сосуды (1000 ml) с 150 мл сахарного раствора (3%). Как вещество для маркировки взялась фосфорная кислота в виде водянного раствора $\text{NaH}_2^{32}\text{PO}_4$. Активность жидкости была 10 millicurie. После двух часов большинство жуков было достаточно маркировано. Не замечалось нарушение лётных качеств у жуков.

Literatur

- ANDREJEW, S. W. et al., Some results of the use of tracer technique in the study of Plant Protection. Second UN Int. Conf. on the Peace Uses of Atomic En., 15/P/2309; 1958.
- , Die Markierung von Schadinsekten mit radioaktiven Isotopen. Presse d. SU, 42 (Ausgabe B), 953—956; 1964.
- BOWEN, V. T., Manganese metabolism of social vespidae. Journ. exp. Zool., 115, 175—200; 1950.
- BOWEN, V. T. et al., The uptake and distribution of Barium 140 and Lanthanum 140 in larvae of *Drosophila repleta*. Journ. exp. Zool., 118, 509—529; 1951.
- CRAIG, R. & OLSEN, N. A., Rate of circulation of the body fluid in adult *Tenebrio molitor* LINNAEUS, *Anasa tristis* (DE GEER), and *Murgantia histrionica* (HAHN.). Sci., 113, 648—650; 1951.
- HAY, C. J. & MYSER, W. C., Use of P^{32} as an aid in biological studies of the leafhopper, *Scaphoideus luteolus*. Journ. econ. Entomol., 54, 1260—1261; 1961.
- JENKINS, D. W., Radioisotopes in ecological and biological studies of agricultural insects. Radioisotopes and Radiation in Entomology. Proceedings of a Symposium, Bombay, 5.—9. December 1960. Ed. IAEA Vienna, 3—21; 1962.
- JOFTES, D. L., Radioautography in the study of radioisotopically tagged substances in insect control. Radiation and Radioisotopes Applied to Insects of Agricultural Importance. Proceedings of a Symposium, Athens, 22.—26. April 1963. Ed. IAEA Vienna, 155—167; 1963.
- QUEDNAU, W., Radioaktive Markierung von Schlupfwespen. Atompraxis, 6, 427—431; 1960.
- QURAIISHI, S. M., FARVAR, R. & ERGÜL, C., Laboratory studies on tagging of *Anopheles stephensi*. Journ. econ. Entomol., 56, 172—174; 1963.