

Deutsches Entomologisches Institut
der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin
Eberswalde

HEINZ ADAM

Untersuchungen über die hämocyitären Reaktionen der
Insektenhämolymph gegen *Bacillus thuringiensis*
BERLINER-Infektionen am Beispiel des Kiefernspanners
Bupalus piniarius LINNAEUS

(Lepidoptera: Geometridae)

Mit 48 Figuren auf 8 Tabellen

Inhalt

Einführung	338
Material und Untersuchungstechnik	338
1. Zuchtmethodik	338
2. Hämatologische Verfahrenstechnik	339
3. Histologische Bearbeitungsverfahren	339
Allgemeines	339
Untersuchungsergebnisse	340
1. Zur Kenntnis des Blutbildes von Raupenstadien des Kiefernspanners <i>Bupalus piniarius</i> (LINNAEUS)	340
a) Klassifizierung der Hämocytenformen	340
b) Die normalen Veränderungen im Blutbild während der Raupenentwicklung	342
2. Der Einfluß von <i>Bacillus thuringiensis</i> auf die Hämolymph von Raupenstadien des Kiefernspanners	344
a) Die Wirkung letaler Dosierungen von <i>Bacillus thuringiensis</i>	344
b) Beobachtungen über die Veränderungen im Raupenblut bei Anwendung suble-taler Dosierungen von <i>Bacillus thuringiensis</i>	347
3. Versuch einer Typisierung der durch eine Bakterieninfektion hervorgerufenen Ver-änderungen in der Hämolymph	350
Zusammenfassung	353
Literatur	353
Tabellen	356
Photographische Dokumentation	360

Einführung

Untersuchungen über die Aufgaben der Insektenhämolymph innerhalb des Stoffwechselgeschehens des Insektenorganismus nehmen in jüngster Zeit einen immer breiteren Raum ein. Dabei stehen die vielfältigen Fragen humoral oder cytär bedingter Immunitäts- oder Resistenzerscheinungen gegen Insektizide, endogene Parasiten, als auch pathogene Mikroorganismen oftmals im Brennpunkt des Interesses.

Da bei der Bekämpfung schädlicher Insektenarten die Anwendung mikrobieller Präparate zunehmend an Bedeutung gewinnt, ergibt sich die Notwendigkeit, einige weitere grundsätzliche Fragen hinsichtlich spezieller Funktionen der Insektenhämolymph zu untersuchen.

Die im folgenden dargestellten Versuche wurden hauptsächlich an Raupen des Kiefernspanners (*Bupalus piniarius* L.) durchgeführt. Dabei kamen unter Laboratoriums- und Freilandbedingungen sieben kommerzielle *Bacillus thuringiensis*-Präparate in verschiedenen Dosierungen zur Anwendung.

Es sollte Aufschluß darüber erlangt werden, inwieweit die bakterielle Wirkung von *Bacillus thuringiensis*-Präparaten durch cytäre Abwehrreaktionen der Hämolymph beeinflusst wird. Weiterhin war es das Ziel der Untersuchungen, die als Folge einer Infektion mit *Bacillus thuringiensis* auftretenden Veränderungen in der Hämolymph von Raupen des Kiefernspanners sowie den Infektionsverlauf anhand von Blutbildern zu erkennen.

Material und Untersuchungstechnik

1. Zuchtmethodik

Zur Gewinnung des Untersuchungsmaterials wurden die aus den Puppen des Kiefernspanners gezogenen Falter in Freilandzuchtkäfige zur Eiablage gebracht.

Um für die einzelnen Versuchsgruppen möglichst gleichaltrige Raupen zur Verfügung zu haben, kamen täglich frisch geschlüpfte Raupen zu je 10 Stück in kleine, mit feuchtem Fließpapier ausgekleidete Petrischalen, in denen sie bis zur ersten Häutung verblieben. Als Futter wurden gut abgespülte Kiefernnadeln geboten. Zum Zeitpunkt der Behandlung mit *Bacillus thuringiensis*-Präparaten wurden 50 gleichaltrige Raupen nach einem bestimmten Versuchsprogramm auf die durch Gazehauben isolierte Wirtspflanzen übertragen. Nach 1–2 Tagen erfolgte die Applikation der Bakterienpräparate mittels Handsprühgeräten. Da es sich bei den Wirtspflanzen um 5–6jährige Kiefern handelte, genügte eine Menge von 50 cm³ pro Pflanze. Aus den Versuchsserien, die mit 1%- und 2%igen Suspensionen behandelt waren, wurden von jeweils drei Tieren einer Versuchsgruppe im 24- bzw. 48stündigem Rhythmus Blutbilder angefertigt. Diese Raupen kamen zur weiteren Beobachtung in gesonderte Glasgefäße.

Als Futter wurden diesen Tieren abgeschnittene Kiefernzweige der entsprechend behandelten Pflanzen geboten. Damit war eine fortwährende Kontrolle über die weitere Wirkung der *Bacillus thuringiensis*-Infektion möglich. Während des gesamten Versuchszeitraums wurde den Raupen nur einmal Blut entnommen.

Etwas anders gestaltete sich die Versuchsdurchführung bei geringeren Konzentrationen. Auf Grund orientierender Vorversuche unter Laboratoriumsbedingungen handelt es sich bei einer Konzentration von 0,5% um eine Dosis, die etwa auf der Grenze zwischen letalem und subletalem Effekt liegt. Deshalb wurde die Anzahl der Versuchstiere auf 100 erhöht und im 24- beziehungsweise 48stündigem Rhythmus von jeweils zwei Raupen Blutbilder hergestellt.

Auf Grund der gesonderten Aufzucht war es möglich, die Häutungsphasen ziemlich genau zu erfassen. Allgemein ließ sich bei den Versuchspopulationen ein Häutungszeitraum von etwa 6—8 Tagen ermitteln.

Parallel zu diesen Versuchen lief gleichzeitig unter denselben Aufzuchtbedingungen jeweils eine Kontrollserie. Damit war eine vergleichende Auswertung der Blutbilder gewährleistet und eine Beurteilung der effektiven Wirkung der zur Anwendung gelangten *Bacillus thuringiensis*-Suspensionen möglich.

2. Hämatologische Verfahrenstechnik

Für die Herstellung von fixierten und gefärbten Blutbildern wurde die den Spannern eigene Fortbewegungsweise ausgenutzt, indem die gebildete „Schlaufe“ des Raupenkörpers mit einer weichen Federpinzette zusammengehalten und die durch einen Einstich in das Rückengefäß hervorquellende Körperflüssigkeit mit der geschliffenen Kante eines Objektträgers abgenommen und mit gleichmäßigem Druck auf einem Deckglas ausgestrichen wurde.

Die Fixierung und Färbung der Ausstriche erfolgte im Anschluß an eine Osmiumräucherung und Kaliumpermanganatpülung nach der MAY-GRÜNWALD-GIEMSA (ROMANOWSKI)-Methode mit folgenden Zeiten: MAY-GRÜNWALD-Fixierung 3 Minuten, MAY-GRÜNWALD-Färbung (Hinzufügen der gleichen Menge destillierten Wassers) 10 Minuten, Färbung nach GIEMSA 35 Minuten.

Zur Ermittlung der relativen Hämocytenzahlen im Blut der einzelnen Raupenstadien wurden mit unwesentlichen Änderungen die gleichen Verfahrenstechniken und -geräte benutzt, wie sie für die entsprechenden Untersuchungen bei *Strongylogaster*-Arten ADAM (1965) zur Anwendung kamen.

3. Histologische Bearbeitungsverfahren

Die Beeinflussung der hämopoietischen Organe durch die Bakterieninfektion wurde fortlaufend anhand histologischer Schnittpräparate ermittelt. Dabei kamen folgende Verfahren zur Anwendung: Fixierung: 7%ige Formollösung, (24 Std.), Auswaschen unter fließendem Wasser (12 Std.), Alkoholstufen 10% bis 90% (jeweils 1 Std.), Isobuthylalkohol (12 Std.), Mythylbenzoat-Celloidin-Gemisch (24 Std.). Benzol- beziehungsweise Benzol-Paraffin-Paraffin (52 °C).

Die Färbung der Schnittpräparate erfolgte nach der von ROMEIS (1948) beschriebenen Azan- oder CROSSMON-Färbung.

Allgemeines

Die Wirksamkeit mikrobieller Präparate ist abhängig vom Endotoxingehalt und gleichberechtigt vom Gehalt an keimfähigen Sporen (Keimprozent). Bei einer Überdosierung kommt es verhältnismäßig schnell zu einer Septikämie (KRIEG 1962), wobei das Endotoxin, indem es die Darmwand zerstört, als Schrittmacher wirkt; bei einer geringeren Dosierung geht der Septikämie erst eine starke Vermehrung der Keime im Darm voraus, wodurch eine Unterdosierung nachträglich ausgeglichen werden kann (WIEGAND 1960).

Auch ist im Kulturfiltrat von bestimmten Varietäten des *Bacillus thuringiensis* ein wirksamer Faktor enthalten, der — mit gewissen Vorbehalten — als „Exotoxin“ bezeichnet wird. Das Exotoxin wird nur von den vegetativen Zellen produziert und eilt damit zeitlich der Endotoxinbildung voraus, die mit der Sporulation zeitlich und funktionell gekoppelt ist (KRIEG 1962).

Zu den ersten unspezifischen Symptomen einer Wirkung des Sporen-Endotoxin-Komplexes gehört es, daß die infizierten Raupen ihre Nahrungsaufnahme einstellen. Im fortgeschrittenen Stadium tritt eine typische Erschlaffung des sonst turgeszenten Raupenkörpers ein. Diese nach der Kontamination auftretenden äußerlichen Erscheinungen gehen auf die spezielle Darmwirksamkeit des Endotoxins zurück; letzteres konnten HELMPEL &

ANGUS (1959) unter anderem anhand von Röntgen-Kontrastdarstellungen am Darm von *Bombyx mori* belegen. Bezüglich der Darmlähmung nimmt MARTOURET (1960) eine neurotoxische Aktion des Endotoxins auf den Darm an.

Ausgehend von den histologischen Befunden TANADAS (1953) bei *Pieris rapae* und HEIMPEL & ANGUS (1959) bei *Bombyx mori*, lösen sich bereits zu einem früheren Zeitpunkt der Erkrankung die Darmzellen von der Basalmembran, die Toxinwirkung wird von ihnen als eine fermentative Auflösung von Zellkitt und der aus einem Mucopolysaccharid bestehenden Zellmembran interpretiert.

Erwähnenswert ist, daß nach ANGUS (1956c) bei der Injektion von gelöstem Endotoxin in der Hämocoel dasselbe bei *Bombyx mori*-Raupen wirkungslos bleibt. Weiterhin soll verschiedentlich kein fermentativer Abbau des parasporalen Kristalls zu dem eigentlichen Toxin im Darmkanal stattfinden. Diese Befunde erklären, warum eine Gruppe von Lepidopteren, die Noctuiden, gegen den Sporen-Endotoxin-Komplex von *Bacillus thuringiensis* praktisch unempfindlich sind (MARTOURET 1962).

Nach BUCHER (1960) ist die aktive Keimabwehr des Wirtsorganismus (Phagozytose, Bakterizidie-Steigerung) nur gegen solche (= apathogene) Bakterien wirksam, die keine Septikämie bewirken, wenn sie in das Hämocoel injiziert werden. Bei den anderen (= pathogenen) Bakterien hingegen wird eine Phagozytoselähmung beobachtet, die auf Proteinase-Wirkung beruhen soll (KRIEG 1961). Daher ist, was die zelluläre Keimabwehr gegenüber *Bacillus thuringiensis* und seinen Verwandten anbetrifft, nach der Injektion dieser Bazillen in Larven von *Bombyx mori*, *Melolontha melolontha* oder *Neodiprion sertifer* eine Phagozytose wirksam.

Eine Erhöhung der Bakterizidie der Hämolymphe vakzinierter Raupen von *Galleria mellonella* (L.) im Sinne von BRIGGS (1958) und STEPHENS (1959) konnten nach Injektion von *Bacillus thuringiensis* oder *Bacillus cereus*-Vakzine als Antigen nicht festgestellt werden (KRIEG 1958).

Eine Produktion echter Antikörper als Ausdruck einer humoralen Keimabwehr bei Insekten wurden nach Injektion von *Bacillus thuringiensis* oder *Bacillus cereus* ebensowenig wie nach Injektion anderer Antigene beobachtet (KRIEG 1957).

Zur aktiven Keimabwehr rechnet KRIEG (1961) vor allem die Phagozytoseaktivität der Hämocyten und die Knötchenbildung. Neben dieser zellulären Keimabwehr sind auch humorale Abwehrreaktionen bekannt geworden, die anfänglich vergleichbar schienen mit der Antikörper- und Antifermentbildung bei Wirbeltieren.

Übereinstimmung herrscht gegenwärtig darüber, daß eine Immunität der Insekten nicht mit der spezifischen Antikörperbildung der Wirbeltiere gleichzusetzen ist.

MALKE (1965) gelang der Nachweis, daß die natürliche Immunität der Schaben gegenüber einer beschränkten Anzahl von Bakterien (Gram-positiv) darin beruht, daß im Insektenkörper das bakteriolytische Enzym Lysozym gebildet werden kann. Das Lysozym ist nach SCHUMACHER (1958) ein Ferment, welches das in der bakteriellen Zellwand vorkommende Mucopolysaccharid lysiert und selbst ein einheitliches basisches Polypeptid darstellt. MESSNER (1965) hat über 120 Insektenarten verschiedener Klassen und Ordnungen auf Lysozymvorkommen getestet und in über 90% der Fälle mit einigen Unterschieden gute Lysozymproduktion nachweisen können.

Untersuchungsergebnisse

1. Zur Kenntnis des Blutbildes von Raupenstadien des Kiefernspanners *Bupalus piniarius* (LINNAEUS)

a) Klassifizierung der Hämocytenformen

Hinsichtlich einer allgemeingültigen Klassifizierung der in der Insektenhämolymphe vorkommenden Hämocytenformen zeigt die neuerliche Durchsicht der Literatur nach wie vor eine Vielfalt unterschiedlicher und sich widerspre-

chender Auffassungen, die es sehr schwierig machen, eine einheitliche Nomenklatur zu vertreten. Nach wie vor wurden deshalb bei der notwendigen Gruppierung der Hämocyten im Raupenblut von *Bupalus piniarius* in der Hauptsache die Arbeiten von ROEDER (1953) und WIGGLESWORTH (1964) als Grundlage benutzt.

In der nachfolgenden Übersicht sind die charakteristischen Zelltypen im Raupenblut des Kiefernspanners aufgeführt.

1. Proleukocyten (im Sinne ROEDERS 1953 und YEAGER & MUNSON 1941) sind in großer Zahl besonders bei Jungraupen und während oder unmittelbar nach einer Häutungsphase zu beobachten. Im Gegensatz zu differenzierten Formen sind sie verhältnismäßig klein ($4-5 \mu$) und an dem riesigen, stark färbbaren Kern leicht zu erkennen, das Zytoplasma ist nur als ein schmaler Saum vorhanden. Sie sind wie bei Tenthredinidenlarven als junge, indifferente, wachsende Formen anzusehen, aus denen spezialisierte Typen hervorgehen können (Fig. 2).

2. Makronucleocyten zeichnen sich als bereits differenzierte und durch ihre Größe ($14-18 \mu$) auffällig gekennzeichnete Zellen aus. Sie besitzen keine feste Gestalt. In der Regel ist der Zellkern im Verhältnis zum Plasmavolumen sehr groß, jedoch lassen sich zwischen ihnen und den Proleukocyten zahlreiche Zwischenstufen beobachten. Das Zytoplasma ist stark basophil (Fig. 1, 22).

3. Mikronucleocyten sind ebenfalls auffällig große, basophile Blutzellen ($12-22 \mu$), die im Gegensatz zu den Makronucleocyten an dem verhältnismäßig kleinen Zellkern zu erkennen sind. Das Zytoplasma ist nur schwer anfärbbar (Fig. 6, 13, 22). Obwohl sie in ihrer Form sehr variabel sind, können sie im Gegensatz zu den entsprechenden Typen bei Tenthrediniden leicht von den basophilen

4. Amöbocyten unterschieden werden. Letztere sind durch ihre spindelförmige Gestalt gekennzeichnet, die häufig bis ins Extreme reicht (Länge $30-40 \mu$, Durchmesser $2-3 \mu$) (vermiformcells ROEDER, 1953). Das Zytoplasma ist leicht anfärbbar (Fig. 3).

5. Plasmacyten. Eine sichere Unterscheidung zwischen diesen, gleichfalls basophilen Blutzellen und den Mikronucleocyten, aber auch oftmals zu den Amöbocyten hinsichtlich der Form ist sehr schwierig (Fig. 4); lediglich die etwas stärkere Färbbarkeit des Zytoplasmas und das Kern-Plasmaverhältnis gegenüber den Mikronucleocyten läßt eine gewisse gesonderte Typisierung zu.

6. Sphaerulazellen sind einheitliche, rundliche Hämocyten, die sich fast immer durch eine etwa „wabenähnliche“ Struktur des Zytoplasmas auszeichnen. Ihre Größe schwankt zwischen 6 und 9μ . Nach LARTSCHENKO (1933), HRDY (1958) und SALT (1955) sind die Zellen mit großen, runden Einschlüssen angefüllt und treten besonders zahlreich während der einzelnen Häutungsphasen auf. Eine sichere Entscheidung, ob sie zu den basophilen oder eosinophilen Typen gehören, ist nicht möglich (Fig. 10).

7. Granulocyten. Dieser Zelltyp ist im Blut von Spannerraupen nicht häufig. Sie gehören zu den eosinophilen Formen. Das leicht färbbare Zytoplasma ist mit verschieden geformten, winzigen (rötlichen) Einschlüssen versehen, die mehr oder weniger zahlreich sein können. In der Regel ist ihr Vorkommen zeitlich gesehen auf die mittlere Phase zwischen zwei Häutungen beschränkt. Ihre Form ist länglich oval bis etwa spindelförmig (Länge $10-12 \mu$, Durchmesser $4-5 \mu$) (Fig. 1).

8. Adipoleucocyten konnten im Spannerblut nicht nachgewiesen werden.

9. Oenozotoide. Dieser bekanntlich vorwiegend sedentäre Zelltyp wurde in den Blutbildern ebenfalls nicht angetroffen und scheint also im Gegensatz zu verschiedenen Tenthrediniden in der Hämolymphe von *Bupalus piniarius* nicht vorzukommen.

In den Blutbildern von Raupenstadien des Kiefernspanners wurden Phagocyten im Sinne eines einzigen funktionsgebundenen Zelltyps nicht beobachtet. Vielmehr ist die Fähigkeit zur Phagocytose in erster Linie den Mikronucleocyten und im weiteren den Makronucleocyten sowie Plasmacyten gegeben.

b) Die normalen Veränderungen im Blutbild während der Raupenentwicklung

Auf der Basis der beschriebenen Versuchsanordnung war es möglich, während der durchschnittlich etwa 80 Tage dauernden Entwicklungszeit der Raupen den Verlauf der auftretenden normalen Veränderungen des Blutbildes zu verfolgen. Die dazu im 48stündigen Rhythmus kontinuierlich angefertigten Blutaussstriche ließen deutlich werden, daß das Verhältnis der einzelnen Hämocytentypen zueinander in den aufeinanderfolgenden Entwicklungsphasen einem ständigen Wechsel unterliegt. Parallel zu diesen, gewissermaßen „qualitativen“ Veränderungen ging ein rhythmischer Wechsel der relativen Hämocytenzahlen einher.

Die gleichfalls kontinuierlich durchgeführten Blutzellenzählungen zeigten, daß zu den Zeiten der Häutungsphasen sich die relativen Hämocytenzahlen einem Tiefpunkt nähern, um danach — etwa zum mittleren Zeitpunkt zwischen zwei Häutungsphasen — ihren Höhepunkt zu erreichen. Diese Erscheinung ist ähnlich der, wie sie bei der Bestimmung der quantitativen Schwankungen der Hämocytenzahlen von *Strongylogaster*-Arten bereits beschrieben wurde (ADAM 1965).

Die Blutbilder 2—3 Tage alter Jungraupen weisen in der Hauptsache Proleukocyten auf; der Anteil bereits spezialisierter Zelltypen (Makronucleocyten, Plasmacyten) ist gering. Dieses Verhältnis ändert sich bereits nach 2—4 Tagen, die Zahl der spezialisierten Typen ebenfalls sehr rasch ansteigt (Fig. 1—7).

Wie die entsprechenden Schnittpräparate zeigen, sind während dieser Phase der Entwicklung die thorakalen und abdominalen Bildungszentren stark vergrößert. Diese bemerkenswert rasche Entwicklung von Proleukocyten zu spezialisierten Zellen ist besonders bei Jungraupen ausgeprägt; obwohl, wie später noch auszuführen sein wird, auch zu anderen Zeiten der Entwicklung Proleukocyten gebildet werden, verlaufen jedoch die Differenzierungsprozesse dann wesentlich langsamer.

Nach etwa 10—12 Tagen, vom Eischlupf an gerechnet, verringert sich die Zahl der Hämocyten von etwa 2,8 Millionen pro mm³ Blut auf weniger als 700000 pro mm³ (Tab. 1). Obwohl die Determination der Blutzelltypen in der Zählkammer nur mit großen Vorbehalten durchzuführen ist, scheint die starke Verringerung der Hämocytenzahlen vorwiegend auf Kosten der bereits spezialisierten Typen zu gehen. Die zu dieser Zeit in den Blutaussstrichen anzutreffenden Makro- und Mikronucleocyten sowie Plasmacyten, aber auch Sphaerulazellen, zeigen in ihrem Zytoplasma mehr oder weniger zahlreiche Vakuolen von unterschiedlicher Größe. Ganz vereinzelt sind auch degenerierende Zellkerne zu sehen (Fig. 7—12). Zwischen 14 und 18 Tagen nach dem Eischlupf erfolgte in der Regel die Häutung zum II. Raupenstadium. Offensichtlich sind

die „qualitativen“ und „quantitativen“ Veränderungen damit in Zusammenhang zu bringen. Während und kurz nach der erfolgten Häutung ist ein rascher Anstieg der Hämocytenzahlen zu verzeichnen und erreicht nach etwa 4–5 Tagen wiederum einen Höhepunkt. In der Anfangsphase überwiegen die Proleukocyten, und erst zum genannten Maximum ändert sich das Verhältnis zugunsten spezialisierter Zelltypen. Blutbilder aus dieser Entwicklungsphase zeigen neben Makro- und Mikronucleocyten einen sehr hohen Anteil an Plasmacyten und nur wenig vakuolisierte Sphaerulazellen. Auffällig ist dabei, daß besonders die Mikronucleocyten und zu einem kleineren Teil auch die Makronucleocyten eine auffällige Größe (bis zu 22μ) besitzen (Fig. 4–7). Weiterhin ist die Formenmannigfaltigkeit der einzelnen Typen, besonders aber der Plasmacyten, bemerkenswert. Diesen Beobachtungen ist hinzuzufügen, daß das Zytoplasma zahlreicher Hämocyten (besonders der Amöbocyten und Mikronucleocyten) stark mit Vakuolen durchsetzt ist, wobei oft die Zellgrenzen sehr diffus erscheinen und nicht klar auszumachen sind. Hierbei ist es oftmals schwierig, eine sichere Trennung zwischen Amöbocyten und Plasmacyten sowie selbst der Mikronucleocyten vorzunehmen, da die Zellkerne ebenfalls sehr voluminös sind. Vereinzelt anzutreffende Granulocyten zeigen wenig auffällige Veränderungen.

Nach etwa 24 Tagen zeigten die Ermittlungen der relativen Hämocytenzahlen eine abfallende Tendenz, um etwa am 28. und 30. Tag wiederum ein Minimum zu erreichen (Tab. 1). In dieser Phase war der Anteil an extrem vakuolisierten Amöbocyten und Plasmacyten sowie Mikronucleocyten und Sphaerulazellen in den Blutbildern besonders groß. Die Anzahl der freien Kerne in der Hämolymphe hatte sich gegenüber der ersten Häutungsphase weiter erhöht. Obwohl das Verhältnis zwischen Proleukocyten und bereits spezialisierten Zellen dieser Entwicklungsphase in der Blutzählkammer nur schwer zu bestimmen war, lassen die gefärbten Blutausrichungen eine Schätzung zu, die ein Verhältnis von etwa 1:5 zugunsten der spezialisierten Typen erkennen läßt.

Dieser ständige Wechsel zwischen indifferenten und spezialisierten Zellen sowie das Ansteigen und Abfallen der relativen Hämocytenzahlen von Häutung zu Häutung wiederholt sich in jeder der vier Entwicklungsphasen (Tab. 1). Eine wesentliche Änderung ergibt sich nach der letzten Häutung. In dieser Periode sind fast keine Proleukocyten in den Blutbildern anzutreffen, ebenso keine der genannten Hämocytenformen, die nicht mehr oder weniger, oftmals extrem vakuolisiert sind, also mit Stoffwechselprodukten überladen scheinen. Weiterhin ist die sehr hohe Zahl an freien Zellkernen auffällig. Verschiedentlich finden sich in den Blutausrichungen Zusammenlagerungen von vielen Zellen unterschiedlicher Typen (sogenannte „Hämocyten-Konglomerate“). Diese Blutbilder sind für diese Phase der Raupenentwicklung charakteristisch.

Es muß allerdings erwähnt werden, daß eine exakte Bestimmung der relativen Zahlen in der THOMASchen Zählkammer schwierig ist, da die verhältnismäßig großen, freien Zellkerne ebenfalls sichtbar sind und vielfach bei der Auszählung mitgewertet werden.

2. Der Einfluß von *Bacillus thuringiensis* auf die Hämolymphe von Raupenstadien des Kiefernspanners

a) Die Wirkung letaler Dosierungen von *Bacillus thuringiensis*

Es kamen folgende kommerzielle Präparate von *Bacillus thuringiensis* zur Anwendung:

Dendrobacillin,	Bactospeine bouillie,
Baktukal,	Entobakterin 3/66,
Biospor 2802,	Biotrol.
Bactospeine mouillable,	

Die Wirkung dieser Mittel wurde neben visuellen Beobachtungen nur anhand der in den Blutbildern beobachteten Veränderungen der beschriebenen Hämocytenformen diagnostiziert. Dabei kamen Dosierungen von 1% und 2% zur Anwendung.

Die Präparate wurden mittels Handsprühgeräten aus einer Entfernung von etwa zwei Metern auf die Zweige gespritzt. Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist dabei zu berücksichtigen, daß die Verteilung der Sprühmittel wesentlich dichter liegt als bei der Ausbringung durch Flugzeuge oder andere Großgeräte.

Es sei vorweggenommen, daß eine unterschiedliche Wirksamkeit der angegebenen *Bacillus thuringiensis*-Präparate anhand der verwendeten Blutbilddiagnostik nicht zu ermitteln war, es sei denn, man zieht den Zeitfaktor in Betracht. Danach wäre die Wirkung von Biotrol, Biospor und Entobakterin am raschesten.

Das zweifellos unterschiedliche Keimvermögen der einzelnen Mittel wurde bei der Beurteilung nicht berücksichtigt.

Da Bakterien-Präparate als Fraßgift wirken, ist bei einem Vergleich ihrer Wirkung untereinander weiterhin zu bedenken, daß nicht die auf das Substrat applizierte Dosis, sondern die von der Appetenz des Wirtes abhängige peroral aufgenommene Menge letztlich für die Wirkung entscheidend ist.

Aus diesen Gründen sind die im Folgenden beschriebenen Beobachtungen für alle sieben verwendeten Mittel insgesamt zusammengefaßt angegeben. Auf Erscheinungen, die möglicherweise auf die Besonderheit eines Präparates zurückzuführen sein könnten, wird besonders verwiesen.

Die Applikation von *Bacillus thuringiensis*-Suspensionen erfolgte 18–20 Tage nach dem Eischlupf der Raupen und etwa 5–6 Tage nach der Häutung zum II. Raupenstadium (Tab. 2–8). Bei einer Dosierung von 1% und 2% waren bereits nach 4–8 Stunden atypische Veränderungen in den Blutbildern zu verzeichnen (Fig. 14–17). Die Intoxikation setzt also bereits ein, wenn die Vermehrungsprozesse der Keime im Darm noch laufen. Offensichtlich treten primäre Darmschädigungen weit früher auf als allgemein angenommen wird.

Diese Veränderungen in der Hämolymphe sind besonders deutlich an der abnormen Vakuolenbildung im Zytoplasma von Mikronucleocyten zu erkennen (Fig. 18); gleichzeitig zeigen Sphaerulazellen eine zunehmende, sehr unregelmäßige Vakuolenbildung, die im Gegensatz zu den Vorgängen im normalen Stoffwechselgeschehen an einem ganz bestimmten Punkt der Zelle beginnen und sich sektorenförmig ausweiten (Fig. 16). Im Verlauf weniger Stunden zeigen auch andere Typen wie Makronucleocyten, Amöbocyten-Plasmatocyten ähnliche Erscheinungen, besonders im Zytoplasma, wobei gleichzeitig eine starke Hypertrophie der Zellkerne einhergeht (Fig. 18–24). Ein weiteres Phänomen, das auf eine bakterielle Infektion schließen läßt, ist die sehr rasche Zunahme der Gesamtblutzellenzahl. Die aus dieser Entwicklungsphase angefertigten Schnitt-

präparate zeigen eine starke Vergrößerung der abdominalen Blutbildungszentren. Es werden dabei Werte erreicht, die die normalen Grenzen wesentlich übersteigen (Tab. 1). Diese Erscheinungen treten nicht nur als Folge einer bakteriellen Infektion auf, sondern sind auch bei Verletzungen oder im Rahmen der Abwehrreaktionen gegen eingedrungene Parasiteneier beobachtet worden (METALNIKOV 1924; PAILLOD 1920; ADAM 1965 et al.). In den Blutbildern konnten zu diesem Zeitpunkt — etwa 15 Stunden nach der erfolgten Infektion — noch keine Bakteriosporen oder vegetative Stadien nachgewiesen werden. Somit sind die beobachteten Veränderungen der Hämocyten auf die Reaktion gegenüber einem stofflichen Prinzip zurückzuführen.

Bis zu 24 Stunden nach der Infektion sind die Verhältnisse nicht wesentlich verändert, mit der Ausnahme, daß die Zahl der von der Infektion betroffenen Hämocytentypen in starkem Maße ansteigt (Fig. 25). Parallel damit treten auch zunehmende Vakuolenbildungen in den stark hypertrophierten Zellkernen, besonders bei Mikronucleocyten und Plasmacyten, auf (Fig. 23, 24).

Interessanterweise lassen sich diese Beobachtungen sehr gut mit den Untersuchungen über Insektizideinwirkungen von A. BLAZEJEWSKA (1966) vergleichen. Die Autorin untersuchte die Kontakt- und Gaswirkung der Insektizide Aldrin, Dieldrin und HCH-Verbindungen auf die Hämolymphe von *Blatta orientalis* LINNAEUS und *Drosophila melanogaster* MEIGEN. Sie stellte fest, daß die verwendeten Präparate pathologische Veränderungen in der Struktur des Zellkerns und des Zytoplasmas von Mikronucleocyten und Amöbocyten verursachen. Die Schädigungen äußern sich durch zunehmend stärker werdende Vakuolenbildung im Nucleus und im Zytoplasma und führen letztlich zur vollständigen Degeneration dieser Hämocyten.

Diese Gleichheit der Ergebnisse läßt darauf schließen, daß die Wirkungsweise von Bakterienpräparaten anfänglich denen von Insektiziden gleichzusetzen ist. Ob es sich bei den durch die Infektion hervorgerufenen Veränderungen der Hämocyten um eine wirkliche Aufnahme bactericider Stoffe in die Blutzelle handelt, bedarf der Nachprüfung durch histochemische Methoden. Offensichtlich deutet die primäre Vakuolenbildung im Zytoplasma auf eine echte Abwehrreaktion hin, die mit den bekannten hämocyten Phagozytoseerscheinungen in Verbindung gebracht werden könnte. Jedoch kann bei diesen Vorgängen nicht von einer Phagozytose die Rede sein, da es sich um eine Aufnahme und anschließende Lokalisierung (Vakuolisierung) flüssiger Stoffe handelt. Hier wäre wohl der Begriff Tinakocytose "T" besser angebracht.

Inwieweit diesen zellulären Abwehrreaktionen primär oder sekundär humorale Immunreaktionen vorausgehen oder ob über die Blutflüssigkeit der Anstoß zur Tinakocytosereaktion an die hämocyten Elemente übermittelt wird, konnte nicht festgestellt werden und bleibt nach wie vor ein allgemein ungeklärtes Problem. Einen Hinweis über eine humoral bedingte Immunreaktion bringen die Arbeiten von MALKE (1965) und MESSNER (1965), wonach im Insektenkörper nach erfolgter bakterieller Infektion das bakteriolytische Enzym Lysozym gebildet wird, das begrenzt eine Immunreaktion ermöglicht.

Der weitere Verlauf der bakteriellen Infektion läßt sich anhand der Blutbilder folgendermaßen darstellen:

Nach etwa 24—28 Stunden zeigten sich in den Blutaussstrichen in zunehmendem Maße Bazillensporen und vereinzelt bereits die ersten vegetativen Stadien (Fig. 29—32). Obwohl unter Umständen zu erwarten war, daß diese zellulären Elemente von den Hämocyten phagocytirt werden (wie beispielsweise Tuscheartikel), konnte das in keinem Fall beobachtet werden. Wenn auch oftmals der Eindruck entstand, war es nicht immer sicher, ob es sich nicht nur um eine oberflächliche Auflagerung — hervorgerufen durch die Fixations- und Färbemanipulationen — handelte (Fig. 33).

Nach etwa 30 Stunden zeigte sich eine rapide Veränderung in den Blutbildern. Die Zahl der vegetativen Stadien von *Bacillus thuringiensis* vergrößerte sich sehr rasch. Dabei kam es zu mehr oder weniger langen Kettenbildungen (Fig. 35, 42). Fast alle Hämocytenformen zeigten beginnende Degenerationserscheinungen, und zwar dergestalt, daß das Zytoplasma der einzelnen Blutzellen mit zahllosen, oft riesigen Vakuolen durchsetzt war und die schon vorher anormal vergrößerten Zellkerne zerfielen (Fig. 32, 36).

In diesem Stadium war es nicht mehr möglich, einzelne Hämocytentypen sicher voneinander abzugrenzen. Gleichzeitig wurden zunehmend freie, degenerierte Zellkerne angetroffen. Offensichtlich durch die Überbeanspruchung der Hämocyten kamen die immer noch zahlreich gebildeten, indifferenten Proleukocyten nicht zur Spezialisierung, sondern zerfielen zu formlosen Elementen (Fig. 39, 41). Wie Vergleichsuntersuchungen aus der Kontrollserie zeigten, beginnen in dieser Entwicklungsphase die vorbereitenden Reaktionen zur zweiten Häutung, das heißt, daß auch unter normalen Bedingungen die Hämocyten funktionell außerordentlich stark beansprucht werden (Tab. 1). In der Mehrzahl der Fälle sind in den Blutbildungszentren bereits deutlich pathologische Veränderungen zu bemerken, die sich vom Zentrum etwa strahlenförmig ausbreiten. In dieser Phase wird also deutlich, daß an erfolgreiche Abwehrreaktionen gegen die *Bacillus thuringiensis*-Infektion seitens des Raupenorganismus nicht mehr zu denken ist. In der Folgezeit zerfließen die von der Infektion betroffenen Hämocyten zu einer formlosen Masse und schließen sich zu mehr oder weniger großen „Konglomeraten“ beziehungsweise „Aggregationen“ zusammen. In diesen Gebilden sind nur noch vereinzelt Zellkernelemente zu erkennen (Fig. 43—48).

Diese Vorgänge sind zeitlich nur schwer voneinander abzugrenzen. Äußerlich erscheinen die Larven als gesund, aber eine genauere Nachprüfung zeigt, daß schon seit geraumer Zeit keine Fraßtätigkeit mehr vorliegt, die Turgeszens des Raupenkörpers völlig nachgelassen hat und die Raupen nur noch passiv auf den Kiefernadeln liegen. In dieser Phase ist also die Agonie schon seit einiger Zeit eingetreten. Aus den Tabellen (2—8) ist ersichtlich, daß eine Infektion mit *Bacillus thuringiensis* bei einer Konzentration von 1% und 2% unter den genannten Bedingungen nach frühestens 5 und spätestens 16 Tagen zum Absterben der behandelten Raupen führt.

Ein zweiter Versuch wurde unter den gleichen Versuchsbedingungen mit Spannerraupen kurz vor der Häutung zum letzten Stadium und einer Präparate-dosis von 1% und 2% durchgeführt. Die dabei auftretenden Erscheinungen in den Blutbildern zeigten nur unwesentliche Unterschiede hinsichtlich des Verlaufes der Infektion. Auch der Zeitraum bis zum Absterben der Raupen war fast gleich wie bei dem Versuch mit Jungraupen des Kiefernspanners.

Wesentlich anders gestalteten sich die Verhältnisse bei der Verwendung von *Bacillus thuringiensis*-Suspensionen geringerer Konzentrationen.

b) Beobachtungen über die Veränderungen im Raupenblut bei Anwendung subletaler Dosierungen von *Bacillus thuringiensis*

Es wurde der Versuch unternommen, die beschriebenen Abwehrreaktionen mittels Unterdosierungen näher zu studieren. Vorversuche mit Dosierungen von 0,1%, 0,2% bis 0,5% zeigten, daß letztere Dosis am besten geeignet war, um die zweifellos begrenzten Abwehrmöglichkeiten des Raupenorganismus deutlicher widerzuspiegeln.

Die Versuchsanordnung sowie die Art der Applikation der Bakterienpräparate wurde gleichfalls nach dem schon beschriebenen Schema, jedoch mit der doppelten Zahl von Versuchstieren durchgeführt. Wie auch bei dem im vorhergehenden Kapitel beschriebenen Ablauf des pathologischen Geschehens nach einer Infektion mit verschiedenen *Bacillus thuringiensis*-Präparaten traten anfangs die gleichen Veränderungen auf. Danach wurden etwa nach 4—8 Stunden die ersten atypischen Erscheinungen, besonders im Zytoplasma von Mikronucleocyten beobachtet. Auf Grund des gewählten Zeitpunktes der Applikation der Bakterienmittel — kurze Zeit nach der Häutung zum II. Raupenstadium — war die Zahl der Blutzellen im stetigen Anstieg begriffen. Wie die Bestimmungen der relativen Blutzellenzahlen zeigten, lag allerdings eine enorm höhere Produktivität der Blutbildungszentren vor, so daß zur Zeit des Kulminationspunktes Werte ermittelt wurden, die fast um das Doppelte höher lagen, als sie unter normalen Entwicklungsbedingungen registriert werden könnten (Tab. 1).

Bei dieser Versuchsanordnung zeigte sich auch deutlich die unterschiedliche Wirkung der verwendeten Präparate, die im Endeffekt an der verschiedenen großen Überlebensrate sehr deutlich zum Ausdruck kam, wobei zweifellos das individuell unterschiedliche Reaktionsvermögen (Abwehrkapazität) der einzelnen Raupen auf eine Bakterieninfektion mit zu berücksichtigen ist (Tab. 2—8).

50 Stunden nach erfolgter Infektion zeigten die Mikronucleocyten, Sphaerulazellen, Amöbocyten-Plasmatocyten starke Veränderungen. Sämtliche spezialisierte Hämocytenformen hatten wesentlich an Größe zugenommen, und die stark hypertrophierten Kerne wiesen ebenfalls Vakuolenbildungen auf. Die Zellgrenzen, speziell der Amöbocyten, wurden zunehmend diffus, und das Plasma erschien wie „ausgefranst“. Die Bestimmung der relativen Blutzellenzahlen zu diesem Zeitpunkt ergab Werte, die weiterhin wesentlich über denen lagen, die aus der Kontrollserie ermittelt wurden. Im Gegensatz zu den Erschei-

nungen bei stärkerer Konzentration zeigten sich nun neben zahlreichen indifferenten Proleukocyten junge, spezialisierte Hämocyten-Formen.

Während bei einem Teil der untersuchten Raupen die Degenerationserscheinungen weiter fortschritten und auf Grund der beginnenden Aggregation kranker, degenerierender Blutzellen auf ein baldiges Absterben der Raupen hindeuteten, zeigten die Blutbilder anderer infizierter Raupen einen auffälligen Kontrast zwischen wenig veränderten und fast vollkommen degenerierten Blutzellen.

Die bei den übrigen Untersuchungen in den Blutaussstrichen beobachteten Übergänge, bei denen alle Stadien von pathologischen Veränderungen der Hämocyten zu verzeichnen waren, fehlten. Diese Beobachtung erregte naturgemäß große Aufmerksamkeit, und es wurde daraufhin der zeitliche Rhythmus der Blutaussstriche auf 24 Stunden verkürzt. Das Ergebnis war, daß nach etwa 8—10 Tagen der Anteil der gesund erscheinenden Hämocytenformen zunahm und die degenerierenden Blutelemente in zunehmendem Maße aus den Blutbildern verschwanden. Die Schnittpräparate wiesen einen höheren Anteil von im Fettkörpergewebe aufgenommener Zellkerne auf als in anderen Fällen. Wie auch das äußere Erscheinungsbild der Raupen zeigte, mußte es dem Raupenorganismus gelungen sein, der Infektion bis zu einem gewissen Grade erfolgreich zu begegnen. Naturgemäß liegt die Schlußfolgerung nahe, diese offensichtlich erfolgreiche Abwehr einer Bakterieninfektion auf die Reaktionen der Hämolymphe zurückzuführen. Sehr wahrscheinlich wird dabei aber auch der Inhibition der Sporenbildung durch den alkalischen Darmsaft eine wesentliche Rolle zuzuschreiben sein.

Die weiteren Untersuchungen des Blutes zeigten nun wiederum, daß sich in der Folge der Anteil der geschädigten Blutzellen erhöhte und in zahlreichen Fällen auch zum Absterben der Raupen führte. Da während des ganzen Zeitraumes der hier wiedergegebenen Beobachtungen keine Bakterien sporen, sondern ausnahmslos vegetative Stadien auftraten, die zu mehr oder weniger langen Ketten zusammengeschlossen waren, liegt für das neuerliche Ansteigen der Infektionswirkung die Schlußfolgerung nahe, daß sekundär von den vegetativen Stadien gebildete „Exotoxine“ dafür verantwortlich zu machen sind. Diese Annahme einer sekundären Intoxikation könnte ihre Bestätigung in der Beobachtung WIEGANDS (1960) und SCHMIDTS (1959) finden, wonach bei einer Bekämpfung von *Hyponomeuta malinella* ZELLER und *Hyphantria cunea* DRURY eine Unterdosierung nachträglich und quasi von selbst durch sekundäre Exotoxinbildung seitens der vegetativen Stadien von *Bacillus thuringiensis* ausgeglichen werden kann.

Es sei vorweggenommen, daß bei diesen Versuchen mit einer Konzentration von 0,5% ein Teil der infizierten Raupen überlebte (Tab. 2—8), wobei der Raupenorganismus offensichtlich in der Lage war, gegen subletale Dosierungen erfolgreich zu reagieren. Der Kurvenverlauf in den Tabellen 2—8 spiegelt deutlich die in den Blutbildern beobachteten wechselnden Veränderungen wider. Interessanterweise kommt es dabei in den Zeiten der Häutungsphasen zu einem

Anstieg von pathologisch veränderten Hämocytenformen und zu weiteren Todesfällen unter den Raupen. Bemerkenswert ist, daß laufend neue, indifferente Blutzellen zu beobachten waren. Die Blutbildungszentren zeigten wohl Veränderungen, die aber offensichtlich keinen wesentlichen Einfluß auf ihre Funktionstüchtigkeit hatten. Diese Beobachtungen lassen sich durch die Bestimmungen der relativen Blutzellenzahlen untermauern. Auffällig ist weiterhin, daß die Häutungsphasen gegenüber der Kontrollserie um 6–8 Tage verzögert waren.

Es sei noch auf eine Beobachtung hingewiesen, die allerdings hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Immunreaktion des Wirtes wohl etwas zweifelhaft ist. In den Blutbildern infizierter Raupen traten kleine, unregelmäßig geformte Gebilde (5–8 μ) auf, die auch unter starker Vergrößerung im Durchlichtmikroskop keine Strukturen erkennen lassen und auf Grund ihrer gleichen Anfärbbarkeit wie die Bakterienstäbchen unter Umständen als von der Hämolymphe isolierte toxische Stoffe gedeutet werden könnten (Fig. 26–28). Hinsichtlich der effektiven Wirksamkeit der Bakterienpräparate ließ sich besonders bei der verwendeten Dosis von 0,5% anhand der Überlebensrate, das heißt an den noch zur Puppenbildung fähigen Spanner-Raupen das Präparat „Entobakterin“ (Tab. 2) vom Präparat „Dendrobacillin“ (Tab. 8) unterscheiden. Bei der Anwendung von Entobakterin-Suspensionen war die geringste Überlebensrate zu beobachten.

Obwohl die Mortalitätsquoten nach etwa 7–9 Tagen verhältnismäßig niedrig lagen (etwa 25%), traten nach 20–22 und 45 Tagen weitere Raupenverluste ein. Dem würde auch entsprechen, daß die Varietät *Bacillus thuringiensis* als starker Exotoxinbildner bekannt ist, wobei das Präparat „Entobakterin“ (*Bacillus cereus* var. *galleriae*) besonders wirkungsvoll zu sein scheint.

Ein Vergleich der in den Tabellen 2–8 graphisch dargestellten Untersuchungsergebnisse spiegelt anhand der Überlebensraten deutlich die unterschiedliche Wirkung der zur Anwendung gelangten verschiedenen *Bacillus thuringiensis*-Präparate wider.

Die Versuche haben somit gezeigt, daß die Raupen des Kiefernspanners über Abwehrmechanismen verfügen, die sie in die Lage versetzen, subletalen *Bacillus thuringiensis*-Infektionen bis zu einem bestimmten Grade zu begegnen.

Im weiteren sei noch auf eine Erscheinung hingewiesen, die, allerdings in einem anderen Zusammenhang, von DRILHON & VAGO (1960) beschrieben worden ist. Allgemein reagieren die Raupenstadien von Lepidopteren auf Verletzungen durch sogenannte „Wundverschlußreaktionen“, die auf die der Insektenhämolymphe eigenen Melanisierungsfähigkeit zurückzuführen ist. Bei den laufenden Blutentnahmen konnte bei den infizierten Raupen anfänglich ein normaler Wundverschluß festgestellt werden. Später waren die Verletzungen der Kutikula nur mit einer offensichtlich luftgetrockneten, dünnen Membran versehen, die nicht mit dem sonst üblichen braunen „Wundpfropf“ vergleichbar ist. Diese Abnahme der Fähigkeit zur Melanisierung ist offensichtlich auf eine durch die Bakterieninfektion verursachte Verringerung des Trypsingehaltes in der Hämolymphe und in der Folge durch einen Ausfall von Phenoloxidasen

zurückzuführen. Damit würde sich auch erklären, warum in der Hämolymphe beziehungsweise im Coelom bakterienverseuchter Spannerraupen keine histocyären Reaktionen beobachtet werden konnten.

Diese Erscheinungen, auch unter der Bezeichnung „Knötchenbildungen“ bekannt (Nodule, giant cell, teratocyte), konnten von METALNIKOV & CHORINE (1929b) an Wachsmotten und am Maiszünsler (*Pyrausta nubilalis* HÜBNER) als Reaktionen der Hämolymphe gegen *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium smegmatis* beobachtet werden.

Nach den Angaben zahlreicher Autoren (HANNAY & FITZJAMES 1955; ANGUS 1956; HEIMPEL & ANGUS 1959a; MARTOUBET 1960 und andere) soll der unterschiedliche pH-Wert der Hämolymphe im pathologischen Geschehen bei *Bacillus thuringiensis*-Infektionen eine wichtige Rolle spielen. Allerdings sind die Meinungen der Autoren dazu sehr widersprüchlich. So konnte KRIEG (1957) bei Raupen von *Pieris brassicae* keinen Anstieg des Hämolymphe-pH im Anschluß an eine *Bacillus thuringiensis*-Infektion nachweisen. Zu dem gleichen Ergebnis kamen auch HEIMPEL & ANGUS (1959) bei anderen Lepidopteren-Raupen. Somit dürfte der Anstieg des Hämolymphe-pH nicht eine allgemeine Voraussetzung für die Wirkung einer *Bacillus thuringiensis*-Infektion sein.

In die hier beschriebenen Untersuchungen wurden diese Erscheinungen ebenfalls einbezogen und unter normalen Bedingungen pH-Werte zwischen 6,7 und 7,1 ermittelt. Dabei ließen sich keine gravierenden Unterschiede zwischen verseuchten und gesunden Raupen feststellen, so daß diese Angaben im einzelnen nicht aufgeführt sind und auch für die Beurteilung einzelner Vorgänge nicht mit herangezogen wurden.

3. Versuch einer Typisierung der durch eine Bakterieninfektion hervorgerufenen Veränderungen in der Hämolymphe

Obwohl die in den vorhergehenden Kapiteln beschriebenen Veränderungen in der Hämolymphe kranker oder gesunder Raupen vielfach deutlich erkennbar waren, bedarf es doch eines intensiven Studiums der Hämocytenformen, um zu einer aussagekräftigen Deutung der beobachteten Erscheinungen zu kommen. Da zudem die Meinungen vieler Autoren über eine allgemeingültige Klassifikation der Hämocyten sehr unterschiedlich sind, bereitet es erhebliche Schwierigkeiten, die besonderen Situationen, wie sie in den Blutbildern zutage treten, voneinander abzugrenzen und entsprechend zu interpretieren. Zum Zweck einer Vergleichbarkeit der erzielten Ergebnisse wurde nun der Versuch unternommen, die bei einer Infektion von *Bacillus thuringiensis* auftretenden Veränderungen in den Blutbildern zu klassifizieren. Unter Verwendung einiger regelmäßig auftretender, charakteristischer Erscheinungen folgte dabei eine Einteilung in vier aufeinanderfolgende Gruppen, wobei auf Grund der besonderen Situationen in den Häutungsphasen der Spanner-Raupen die Gruppen 0 und I zusammengefaßt dargestellt sind (Tab. 2—8).

Gruppen 0 und I:

In diesem Fall handelt es sich um Blutzellen, die in keiner Weise sichtbare Veränderungen zeigen, die auf irgendwelche äußeren Beeinflussungen zurückzuführen wären.

In den Blutbildern sind neben dem von der jeweiligen Entwicklungsphase abhängenden Anteil an Proleukocyten und den vielfältigen Übergangsformen zu spezialisierten Elementen Mikronucleocyten, Makronucleocyten, Sphaerulazellen, Amöbocyten-Plasmatocyten und andere zu beobachten, die keine atypischen Veränderungen aufweisen. Wenn Veränderungen, zum Beispiel Vakuolenbildungen im Zytoplasma, auftreten, sind sie auf die normalen Stoffwechselläufe zurückzuführen, wie sie besonders zu den Zeiten der Häutungen zu beobachten sind. Anhand der Färbungen sind deutlich basophile und eosinophile Typen voneinander zu unterscheiden, ebenso lassen sich die einzelnen Formen auf Grund ihrer Größe und sonstiger morphologischer Merkmale gut voneinander trennen. Die Blutflüssigkeit selbst ist klar und färbt sich nicht durch die verwendeten Farbstoffe an (Fig. 14–25).

Gruppe II:

Einzelne Zelltypen, vorwiegend Mikronucleocyten, aber auch zum Teil Sphaerulazellen zeigen abweichende Formgestaltungen. Im Zytoplasma treten zahlreiche, unregelmäßige Vakuolen auf, die teilweise von den normalen Verhältnissen in den Häutungsphasen unterschieden sind. Auch die schwächere Anfärbbarkeit des Zytoplasmas, speziell der Mikronucleocyten, kann als Unterscheidungsmerkmal herangezogen werden. Unter Berücksichtigung der speziellen Entwicklungsphase ist die Zahl der auftretenden Proleukocyten, aber auch der spezialisierten Typen angestiegen. Übergangsformen von Proleukocyten zu spezialisierten Formen zeigen ebenfalls atypische Veränderungen (winzige Vakuolen am Plasmarand). In den Sphaerulazellen treten atypische, sektorenförmig angeordnete und unregelmäßig gestaltete Vakuolen auf. Vereinzelt sind stark hypertrophierte Amöbocyten-Plasmatocyten anzutreffen. Besonders Makronucleocyten zeigen eine auffällige abnorme Affinität zu den verwendeten Farbstoffen (Fig. 26–36).

Gruppe III:

Fast alle zur Phagocytose befähigten Zelltypen, besonders Mikronucleocyten, zeigen sehr zahlreiche Vakuolen im Zytoplasma. Die ansonsten in den Präparaten homogen scheinenden Zellkerne erhalten eine granulöse Struktur und ebenfalls vereinzelt Vakuolen. Fast alle dieser Typen sind merkbar vergrößert. Die Plasmagrenzen von Plasmatocyten sind undeutlich. Die Anfärbbarkeit ist schwächer. Sphaerulazellen zeigen durch riesige Vakuolen septenförmig gegliederte, innere Strukturen, die Reste des Zytoplasmas darstellen. Die Zahl der Proleukocyten ist weiter gestiegen. Übergangsformen zu spezialisierten Typen treten nur noch sehr vereinzelt auf. Teilweise sind bereits Aggregationen, vornehmlich von Amöbocyten-Plasmatocyten anzutreffen, die unregelmäßig verteilt, zerfallene Kernelemente beinhalten. Die Blutflüssigkeit ist mitunter stark getrübt und manchmal auch leicht angefärbt, so daß unter dem Mikroskop eine scharfe Abbildung der Zellen schwierig wird. Vereinzelt sind Bakteriensporen, aber auch bereits vegetative Stadien in den Blutbildern zu erkennen (Fig. 37–42).

Gruppe IV:

Alle Hämocytenformen zeigen pathologische Veränderungen. Proleukocyten sind fast gänzlich aus den Blutbildern verschwunden. Es treten zahlreiche, freie, degenerierte Zellkerne auf. In den kaum noch voneinander zu unterscheidenden, stark hypertrophierten einzelnen Hämocytenformen sind im Nucleus und Zytoplasma überdimensionale Vakuolen zu beobachten; weiterhin zeigt das Zytoplasma zahlreicher Hämocyten deutlich Degenerationserscheinungen. Die Erkennbarkeit der Blutelemente im Präparat ist durch die weitere Trübung und teilweise starke Anfärbbarkeit des Blutplasmas wesentlich beeinträchtigt. Sphaerulazellen sind fast nicht mehr anzutreffen. Die Zahl der Zellaggregationen hat wesentlich zugenommen und ist oftmals schon zu einem nicht mehr definierbaren Gebilde umgewandelt. Ebenfalls sind zahlreiche, degenerierende, im Zerfall begriffene Zellkerne anzutreffen. Durch die rasche Vermehrungspotenz ist die Zahl der vegetativen Stadien von *Bacillus thuringiensis* oftmals ins Riesenhafte angewachsen (Fig. 42—48).

Der zeitliche Verlauf der hier im einzelnen dargestellten Veränderungen ist naturgemäß von verschiedenen Faktoren abhängig, einmal von der Dosierung des Präparates, von dessen Virulenz und Keimfähigkeit der Sporen und zum anderen von der Appetenz des Wirtes. Weiterhin spielt das jeweilige Entwicklungsstadium der Raupen, besonders hinsichtlich der kritischen Häutungsphasen, eine wesentliche Rolle. Es konnten Fälle beobachtet werden, in denen das applizierte *Bacillus thuringiensis*-Präparat bei einer Dosierung von 1% und 2% bereits nach 4—5 Tagen zum Absterben der Raupen führte, aber auch, daß Raupen aus der gleichen Versuchspopulation nach 12 Tagen erst Veränderungen zeigten, die der Gruppe III zuzuordnen sind. Besonders deutlich werden die auf den Infektionsverlauf einflußnehmenden Faktoren bei Verwendung subletaler Dosierungen. In den Tabellen 2—8 sind die entsprechenden Ergebnisse — unter Berücksichtigung der gebrauchten Gruppierungen — der pathologischen Veränderungen in den Blutbildern graphisch dargestellt.

Die Untersuchungen über die Wirkungen von *Bacillus thuringiensis*-Infektionen auf die Hämolymph von Kiefernspannerraupen zeigten, daß der Verlauf und auch die jeweilige Phase der Infektion anhand von typischen Merkmalsänderungen in den jeweiligen Blutbildern nachzuweisen sind.

Wie entsprechende Versuche einer Bakterieninfektion an Raupen von *Hyponomeuta spec.*, Larven des Kartoffelkäfers (*Leptinotarsa decemlineata* SAY), *Rhyacionia buoliana* SCHIFFER-MÜLLER und *Macrothylacia rubi* RAMBUR ergeben haben, treten auch hier Veränderungen in der Hämolymph auf, die nachweislich auf die erfolgte Infektion mit *Bacillus thuringiensis* zurückzuführen sind. Die vergleichende Auswertung der Blutbilder zeigte ebenfalls typische Merkmale, auf Grund derer der Grad und die Intensität der Infektion zu bestimmen sind.

Die von BLAZEJEWSKA (1966) durch Insektizideinwirkungen hervorgerufenen Veränderungen in der Hämolymph von *Pteronidea (Nematus) ribesii* SCOPOLI, *Drosophila melanogaster* MEIGEN, *Pieris brassicae* LINNAEUS, *Blatta orientalis* LINNAEUS und *Leptinotarsa decemlineata* SAY werden von der Autorin ebenfalls als signifikant angesehen.

Schließlich sei auch auf die Untersuchungen MESSNERS (1965) verwiesen, wonach vom Stand der jetzigen Kenntnisse der humoralen Abwehrreaktionen (Lysozym-Muramidase) bei Insekten im Zusammenwirken mit anderen aktiven und passiven Schutzeinrichtungen

Aussagen über die Brauchbarkeit bestimmter Bakterienarten als bakterielle Insektizide gemacht werden können.

Es liegen bereits Anzeichen vor, daß die humorale Reaktionsbereitschaft als ein einfacher Indikator für den Gesundheitszustand der Insekten in der prognostischen Schädlingsbekämpfung ausgenutzt werden kann.

Es bleibt einer Nachprüfung unter Praxisbedingungen vorbehalten, inwieweit diese Möglichkeiten zur Einschätzung des Gesundheitszustandes einer Schädlingspopulation, der Beurteilung eines zur Bekämpfung eingesetzten chemischen oder mikrobiellen Präparates für eine Prognosetätigkeit herangezogen werden können.

Zusammenfassung

Die Untersuchungen geben Aufschluß über die Wirkung von *Bacillus thuringiensis* BERLINER auf Raupen des Kiefernspanners *Bupalus piniarius* LINNAEUS. Der Infektionsverlauf wurde anhand von Blutbildern verfolgt. — Es konnte der Nachweis erbracht werden, daß die bei einer Infektion von *Bacillus thuringiensis* auftretenden Veränderungen in der Hämolymphe typisch und klassifizierbar sind.

Summary

These studies furnish information about the effects of *Bacillus thuringiensis* BERLINER on caterpillars of the pine moth *Bupalus piniarius* LINNAEUS. The course of the infection was observed by blood counts. It was established that the changes in the haemolymph which occur with an infection by *Bacillus thuringiensis* are typical and can be classified.

Резюме

Исследования дают объяснение о влиянии *Bacillus thuringiensis* BERLINER на гусеницы *Bupalus piniarius* LINNAEUS. Ходом инфекции следили на основе картины крови. Могли дать доказательство, что возникающие во время инфекции с *Bacillus thuringiensis* изменения гемолимфы типичны и их можно классифицировать.

Literatur

- ADAM, H. Die hämocytären Abwehrreaktionen des Blutes von *Strongylogaster xanthoceros* (STEPHENS) und *Strongylogaster lineata* (CHRIST) gegen die endoparasitische Ichneumonide *Mesoleius niger* (GRAVENHORST), (Hymenoptera: Tenthredinidae und Ichneumonidae). Beitr. Ent. 15, 785—980; 1965.
- ANGUS, T. A. The reaction of certain Lepidopterous and Hymenopterous larvae to *Bacillus sotto* toxin. Canad. Ent. 88, 280—283; 1956 c.
- BERLINER, E. Über die Schlafsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia künigella* ZELL.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis*, n. sp. Ztschr. angew. Ent. 2, 29—56; 1915.
- BLAZEJEWSKA, A. Patologiczne zmiany w przewodzie pokarmowym i jajnikach macznika mlynarka — *Tenebrio molitor* L. (Col., Tenebrionidae) pod wpływem HCH. Polskie pismo Ent., Serie B, 1; 1966.
- Patologiczne zmiany w hemocytach larw karaczana wschodniego — *Blatta orientalis* L. (Blattodea, Blattidae) pod wpływem preparatu Aldrin. Polskie pismo Ent., Serie B, 16; 1966.
- BODINE, J. H. et al. Protyrosinase und Tyrosinase im Ei von *Melanopus*. Journ. Cell. Comp. Physiol. 11, 409—423; 1938 ... 12, 71—84; 1938 ... 18, 151—160; 1940. Journ. Gen. Physiol. 24, 99—103; 423—432; 1940.

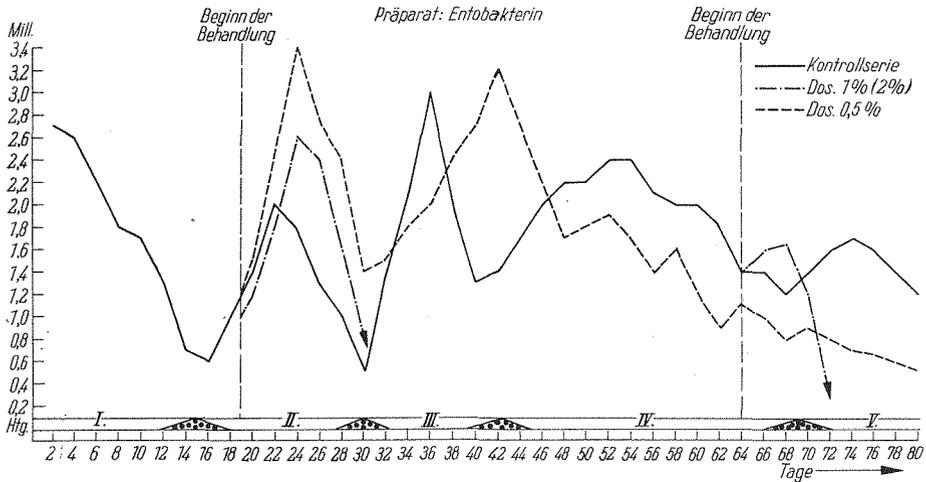
- BRIGGS, J. D. Humoral immunity in lepidopterous larvae. Journ. exp. Zool., Philadelphia, **138**, 155—188; 1958.
- BUCHER, G. E. Potential bacterial pathogens of insects and their characteristics. Journ. Insects Path. **2**, 172—195; 1960.
- CAPPELLATO, M. & NARPOZZI, A. Fathori die immunita aspecifica nell' emolinfia die *Bombyx mori* BOLL. I st. Sieroterap., Milan, **39**, 40—73; 1960.
- CHORINE, V. Immunität bei Insekten: *Galleria*, Lep. Bull. Biol. Fr. Belg. **65**, 381—393; 1931.
- DRILHON, A. & VAGO, C. Recherches sur le mécanisme d'action de *Bacillus thuringiensis*. — Effet de la toxémie sur les fractions protéiques de l'hémolymphhe. In: ANTONIE VAN LEEUWENHOEK Journ. Microbiol., Serol. **26**, 407—412; 1960.
- ERMIN, R. Über Bau und Funktion der Lymphocyten bei Insekten (*Periplaneta americana* L.) Ztschr. Zellforsch., Mikrosk., Anat. **29**, 5, 613—669; 1939.
- FRINGS, H. Antibacterial action of the blood of the large milkweed bug. Science **108**, 689—690; 1948.
- HANNAY, C. L. & FITZ-JAMES, P. The protein crystals of *Bac. thuringiensis* BERLINER. Canad. Journ. Microbiol. **1**, 694—710; 1955.
- HEIMPEL, A. M. & ANGUS, T. A. The site of action of crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. I. Insect Path. **1**, 152—170; 1959a.
- HRDÝ, I. Krevni obraz imaga cvrčka *Gryllus domesticus* L. Čas. Českosl. Spol. Ent. **55**, 301—315; 1958.
- KRIEG, A. Über Aufbau und Vermehrungsmöglichkeiten von stäbchenförmigen Insekten-Viren. Ztschr. Naturf. **12b**, 2; 1957.
- Versuch eines Nachweises von echten Antikörpern in der Insektenhämolymphhe mit Hilfe der Retentionsselektrophorese. Naturwiss. **10**, 44; 1957.
 - Weitere Untersuchungen zur Pathologie der Rickettsiose von *Melolontha spec.* Ztschr. Naturf. **13b**, 6; 1958.
 - Immunität bei Insekten (Ein Beitrag zur vergleichenden Immunologie). Ztschr. Immunitätsf. exp. Ther., 115; 1958.
 - *Bacillus thuringiensis* BERLINER. Über seine Biologie, Pathogenie und Anwendung in der biologischen Schädlingsbekämpfung. Mittl. Biol. Bundesanst. Land- u. Forstw., Berlin-Dahlem, 103; 1961.
 - Neues über insektenpathogene, kristallbildende Bazillen. Anz. Schädlingsk. **35**, 12; 1962.
- LARTSCHENKO, K. Die Unempfindlichkeit der Raupen von *Loxostege sticticalis* L. und *Pieris brassicae* L. gegen Parasiten. Ztschr. Parasitenk. **5**, 679—707; 1933.
- MALKE, H. Wirkung von Lysozym auf die Symbionten der Blattiden. Ztg. allgem. Mikrobiol. **4**, 88—91; 1964.
- Über das Vorkommen von Lysozym in Insekten. Ztg. allgem. Mikrobiol. **5**, 42—47; 1965.
- MARTOURET, D. Études préliminaires sur le mode d'action des *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* BERLINER vis à vis de *Pieris brassicae* L. Verh. XI. int. Ent. Kongr., Wien, 1960.
- Les toxines de *Bacillus thuringiensis* et leur processus d'action chez les larves de Lépidoptéris. Meded. Landbouwoogesch., Opzoek, stat., Gent, **26**, 1116—1126; 1962.
- MESSNER, B. Das Lysozymvorkommen in Beziehung zur unspezifischen Immunität der Insekten. Sonderdr. aus Verhandl. Dtsch. Zool. Gesellsch., Jena; 1965.
- METALNIKOV, S. L'infection microbienne et l'immunité chez la mite des abeilles *Galleria mellonella*. Paris, 138 pp.; 1927.

- METALNIKOV, S. & CHORINE, V. Experiments on the use bacteria to destroy the corn borer. *Sci. Rep. Int. Corn Borer Invest.*, **2**, 54—59; 1929 b (s. auch *Ann. Inst. Pasteur Paris*, **43**, 136—151; 1929; 1391—1395; 1657—1678).
- PAILLOT, A. La karyokinétoze, nouvelle réaction d'immunité naturelle observée chez les chenilles de Macrolépidoptères. *Compt. rend. Séance Soc. Biol.* **83**, 278—279; 1920.
- PILLEMER, L., BLUM, L., LEPOW, I. H., ROSS, O. A., TODD, W. E. & WARDLAW, A. C. The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science* **120**, 279—285; 1954.
- ROEDER, K. D., (Editor). *Insect Physiology* (p. 218—231). New York & London, XIV & 1100 pp.; 1953.
- ROMEIS, B. *Mikroskopische Technik*. 15. Aufl. München, XI & 695 pp.; 1948.
- SALT, G. Experimental studies in insect parasitism. VIII. Host reactions following artificial parasitization. *Proc. Roy. Soc. London, B*, **144**, 380—398; 1955.
- SCHMIDT, H. *Das Properdin*, Darmstadt; 1959.
- SCHUMACHER, H. Neue Erkenntnisse über die Biochemie des Lysozyms und ihre klinische Bedeutung für die Augenheilkunde. *Fortschr. Augenheilk.* **8**, 142—211; 1958.
- SCHWENKE, W. Untersuchungen zum Massenwechsel der Kiefernspanner *Bupalus piniarius* L. und *Semiothisa liturata* Cl. auf vergleichender biozönotischer Grundlage. *Beitr. Ent.* **2**, 1—55; 1952.
- STEINHAUS, E. A. *Insect Microbiology*. Ithaca, N. Y., X & 763 pp.; 1946.
- STEPHENS, I. M. Immune responses of some insects to some bacterial antigens. *Canad. Journ. Mikrobiol.* **5**, 203—228; 1959.
- Immunity in Insects. In: E. A. STEINHAUS *Insect. Path.* **1**, 273—297, New York, London; 1963.
- TANADA, Y. Susceptibility of the imported cabbageworm *Bacillus thuringiensis* BERLINER. *Proc. hawaii. ent. Soc.* **15**, 159—166; 1953.
- TAUBER, O. E. & YEAGER, J. F. Zählung der Blutzellen bei verschiedenen Insekten. *Ann. Ent. Soc. Amer.* **28**, 229—240; 1935 . . . **29**, 112—118; 1936. *Iowa Sta. College Journ. Sci.* **9**, 13—24; 1934.
- WAGNER, R. Acquired resistance to bacterial infection in insects. *Bacteriol. Revs.* **25**, 100—110; 1961.
- WIEGAND, H. Der Wirkungsbereich von *Bacillus thuringiensis* BERLINER. *Tagungsber. Dtsch. Akad. Land. Wiss. Berlin* **29**, 65—72; 1960.
- WIGGLESWORTH, V. B. The Physiology of the cuticle and of ecdysis in *Rhodnius prolixus* (Triatomidae: Hemiptera) with special reference to the function of the oenocytes and of the dermal glands. *Quart. Journ. microscop. Sci. N.S.* **76**, 269—318; 1934.
- The haemocytes and connective tissue formation in an insect. *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Quart. Journ. microscop. Sci. N.S.* **97**, 89—98; 1956.
- Insect blood cells. *Ann. Rev. Ent.* **4**, 1—16; 1959.
- Physiologie der Insekten. (Lehrb. u. Monogr. exakt. Wiss., Reihe exper. Biol. **14**). 2. Aufl. Stuttgart, 823 pp.; 1959.
- The life of insects. XII, London, 360 pp.; 1964.
- YEAGER, J. F. & MUNSON, S. C., Changes induced in blood cells of the southern armyworm (*Prodenia eridania*) by the administration of poisons. *Journ. Agr. Res.* **64**, 307—332; 1941/1942.
- YEAGER, J. F., SHULL, F. W. & FARRAR, M. D. On the coagulation of blood from the cockroach, *Periplaneta orientalis*, with special reference to blood smears. *Iowa Sta. College Journ. Sci.* **6**, 325—339; 1932.
- YEAGER, J. F. & TAUBER, O. E. Determination of total blood volume in cockroach *P. fuliginosa*; with special reference to method. *Ann. Ent. Soc. Amer.* **25**, 315—327; 1932.

Tabellen

Tabelle I

Graphische Darstellung der periodischen Schwankungen der Hämocytenzahlen während der Raupenentwicklung von *Bupalus piniarius* L. am Beispiel des *Bac. thuringiensis*-Präparates „Entobakterin“



Tabellen 2 bis 8

Graphische Darstellung der Beobachtungsergebnisse über den Infektionsverlauf von *Bacillus thuringiensis* BERLINER in den verschiedenen Raupenstadien von *Bupalus piniarius* LINNAEUS

Die Ziffern 0 bis IV auf der Ordinate stellen die Symbole der Blutbildgruppen dar; somit ist aus der Tabelle ersichtlich, daß beispielsweise bei Anwendung einer 1%igen *Bac. thuringiensis*-Suspension (Entobakterin) bereits nach drei Tagen pathologisch veränderte Hämocytenformen auftreten, die dem Typ I bis II entsprechen; nach weiteren zwei bis vier Tagen ist die Infektion soweit fortgeschritten, daß daneben auch Veränderungen zu verzeichnen sind, die den Gruppen III und IV zuzuordnen sind. Allgemein ist in diesen Fällen die kritische Phase überschritten. Die Raupen zeigen keine Fraßtätigkeit, und nach kurzer Zeit tritt der Tod ein. Die Dreieck-Symbole in der Spalte „Kontrolle“ dokumentieren die kontinuierlichen Blutkontrollen der jeweiligen „Kontrollserien“. Unter der Bezeichnung „Htg.“ sind die einzelnen Häutungsphasen zu verstehen, die für die jeweilige Versuchspopulation insgesamt angegeben sind.

Tabelle 2

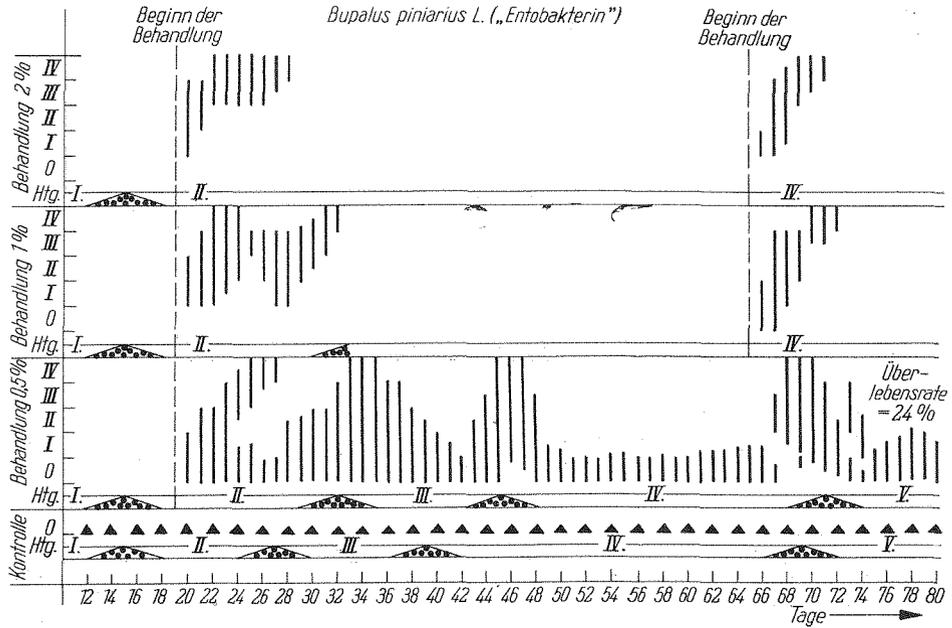


Tabelle 3

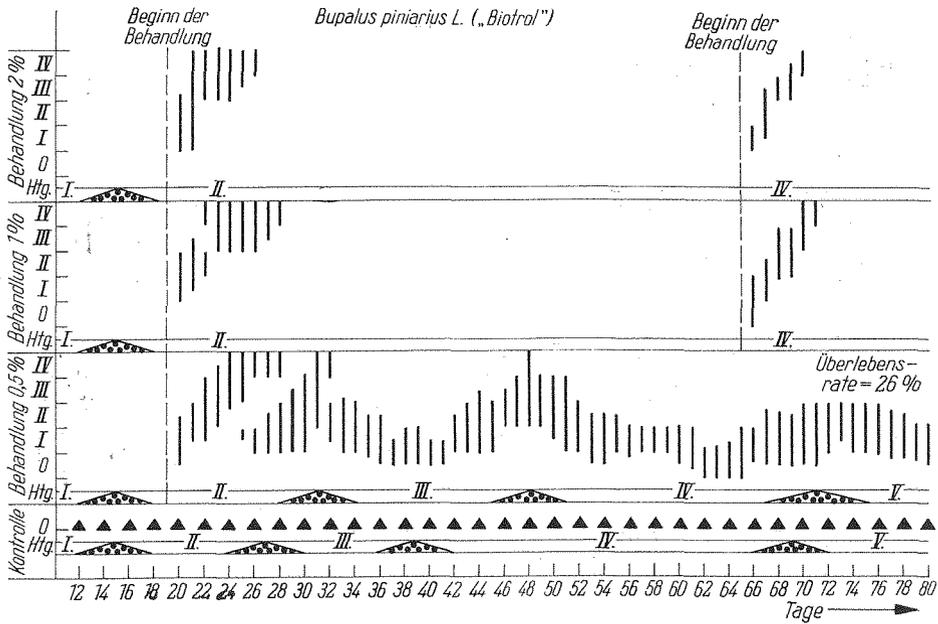


Tabelle 4

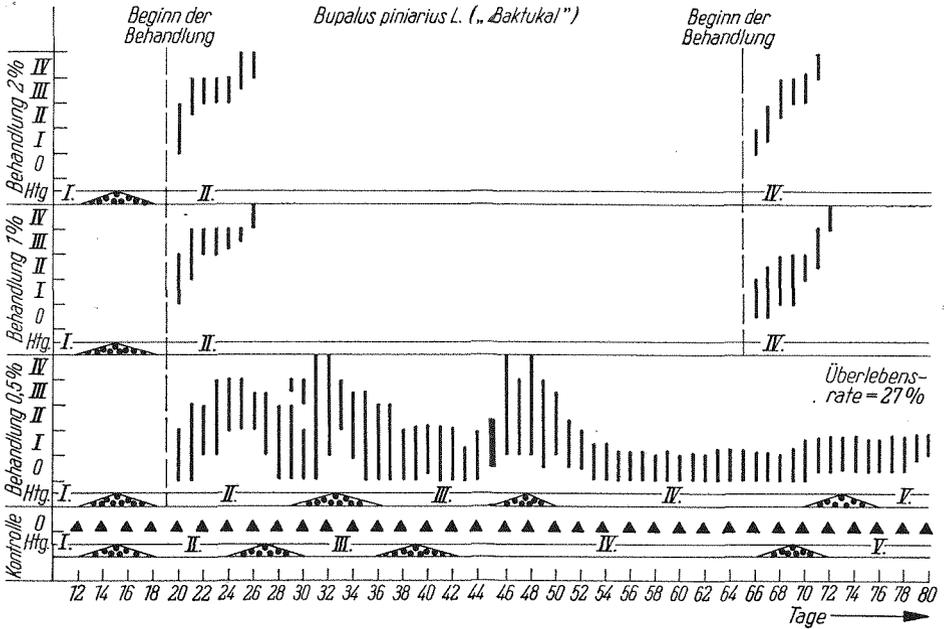


Tabelle 5

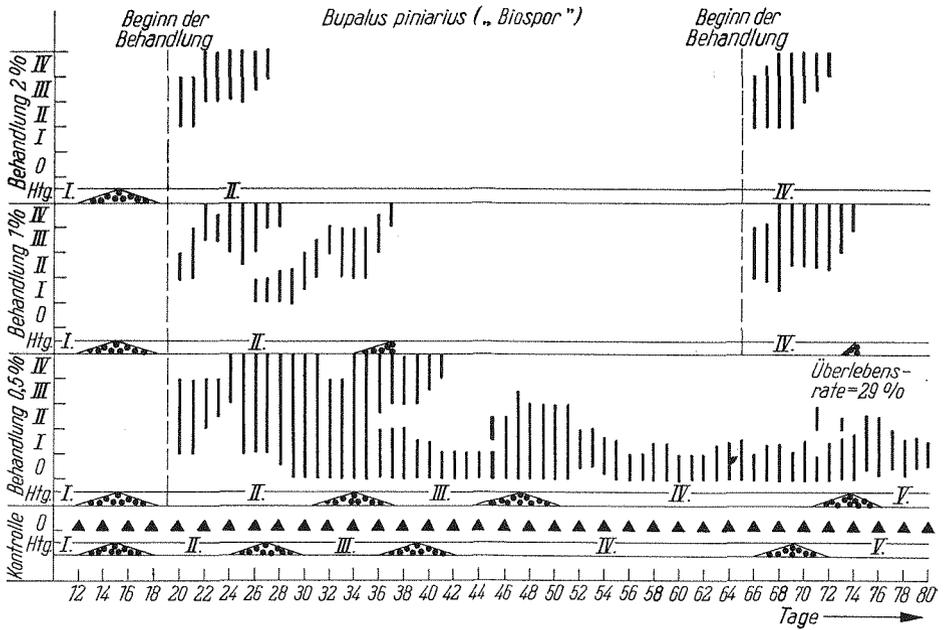


Tabelle 6

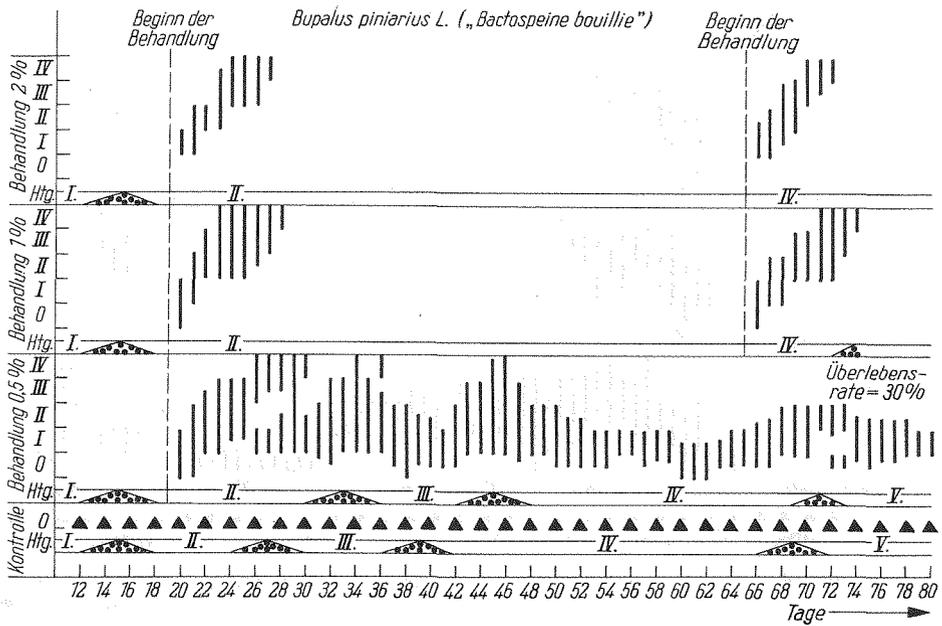


Tabelle 7

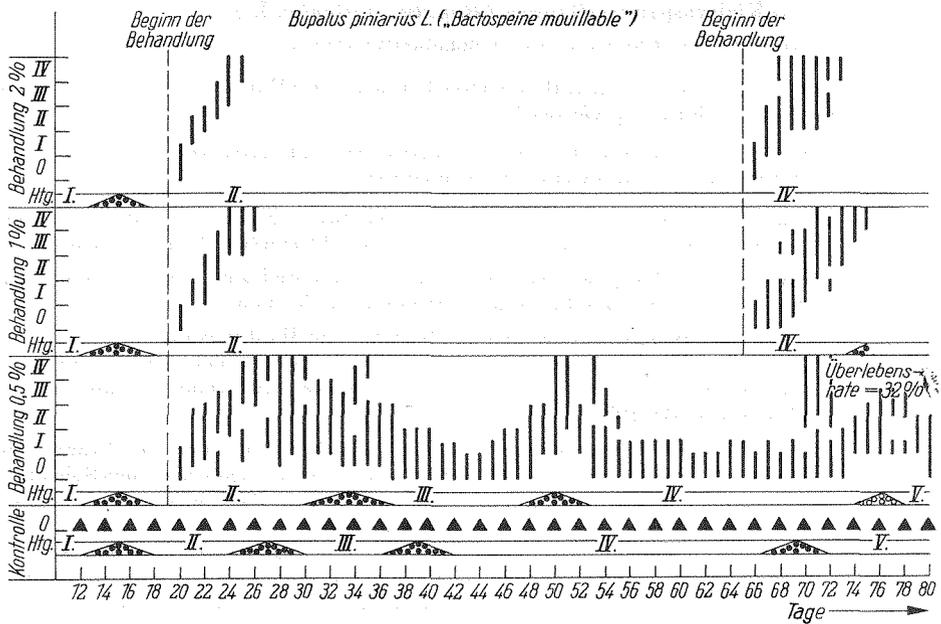
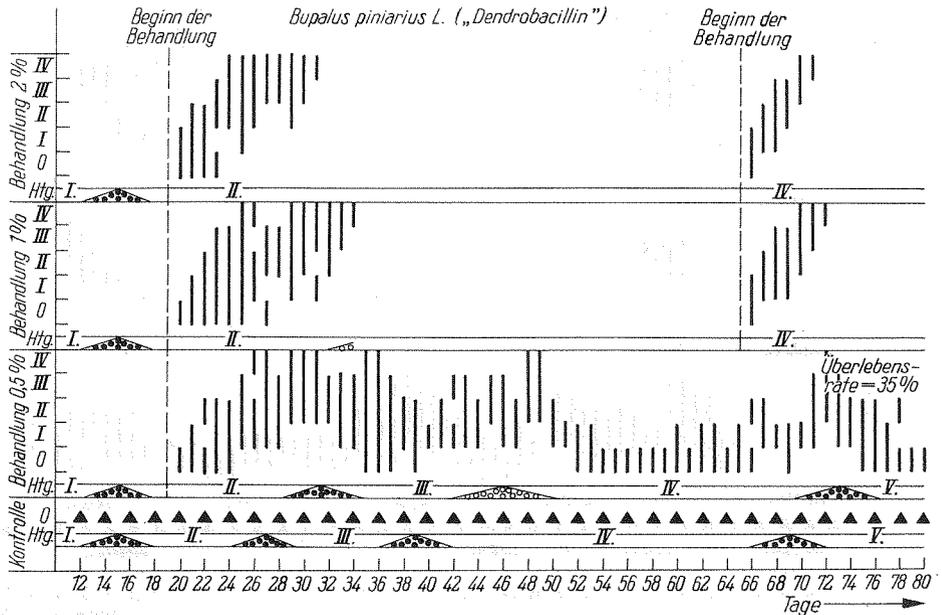


Tabelle 8



**Photographische Dokumentation des Ablaufes
des pathologischen Geschehens in der Hämolymphe
von Kiefernspanner-Raupen (*Bupalus piniarius* L.)
bei *Bacillus thuringiensis* BERLINER-Infektionen**

1. Zur Kenntnis der verschiedenen Hämocyten-Formen in der Hämolymphe der Raupen des Kiefernspanners *Bupalus piniarius* L.

Abkürzungen: Pl = Proleukocyten, Ma = Makronucleocyten, Mi = Mikronucleocyten, Am = Amöbocyten, Pla = Plasmatoocyten, Sph = Sphaerulazellen, Gr = Granuloocyten.

Fig. 1 und 2. Raupe ca. 36 Stunden nach der Häutung zum II. Stadium. Normale Blutbilder mit spezialisierten Zelltypen und indifferenten Proleukocyten

Fig. 3. Raupe kurz nach der Häutung zum III. Stadium. Die Abbildung zeigt eine Gruppe von typischen spindelförmigen Amöbocyten

Fig. 4–6. Besonders in der Zeit vor beginnenden Häutungsphasen treten in den Blutbildern Mikronucleocyten auf, die stark vergrößert sind und in ihrem Zytoplasma Einschlüsse aufweisen, die vielfach als Glykogene gedeutet werden (WIGGLESWORTH 1959)

Fig. 7–12. Sie zeigen Beispiele charakteristischer Blutbilder, die während der Häutungsphasen auftreten. Neben Mikronucleocyten zeigen besonders Sphaerulazellen typische Vakuolenbildungen im Zytoplasma; aber auch andere Hämocytenformen sind in diese Prozesse mit einbezogen.

In der Abbildung 9 sind neben auffällig hypertrophierten Makronucleocyten freie Zellkerne bereits degenerierter Hämocyten sichtbar, die entweder von anderen Zellen phagozytiert oder im Fettkörpergewebe abgebaut werden

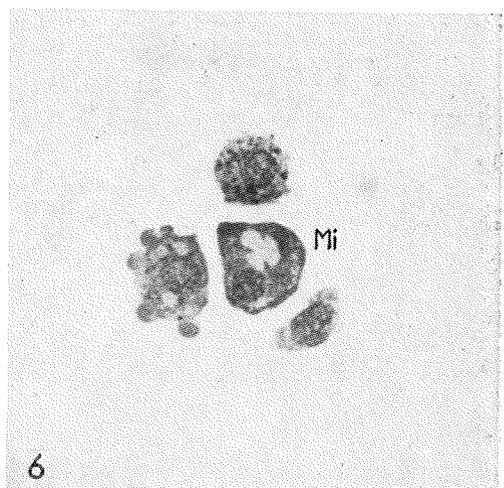
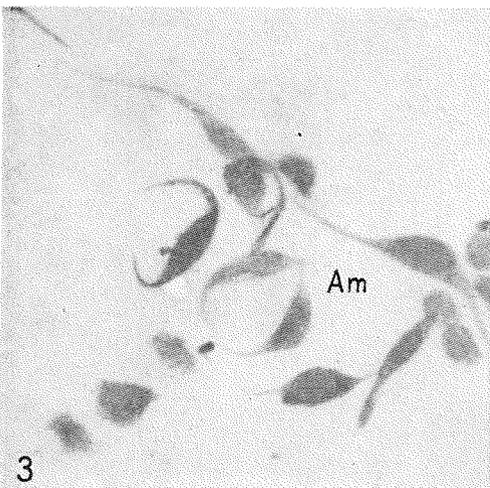
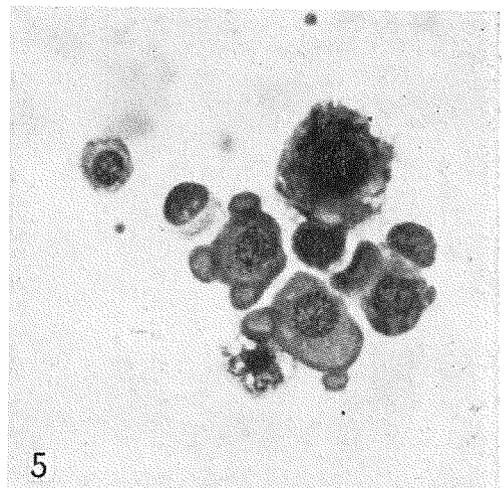
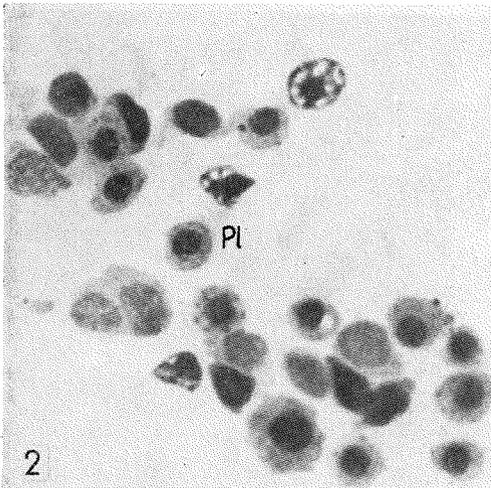
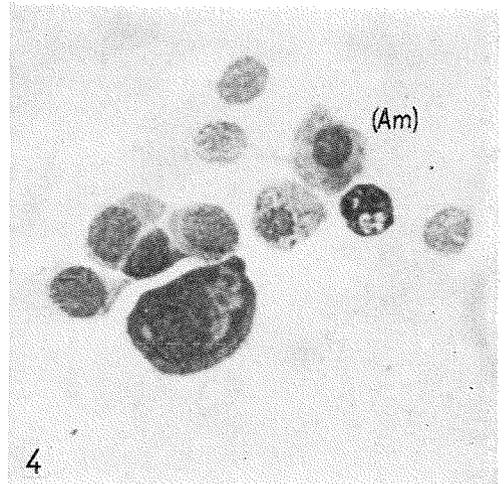
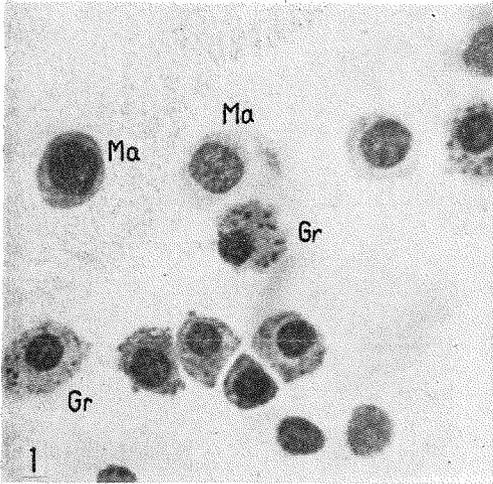


Fig. 1-6

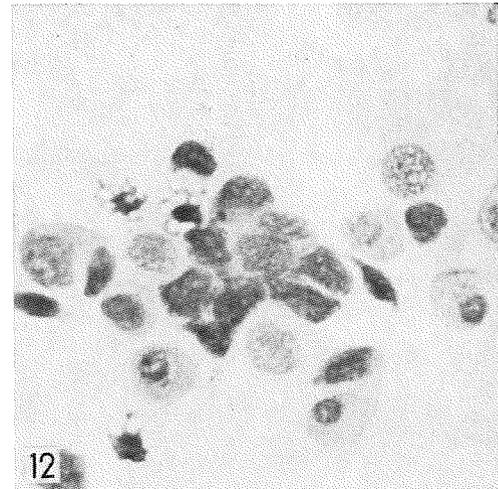
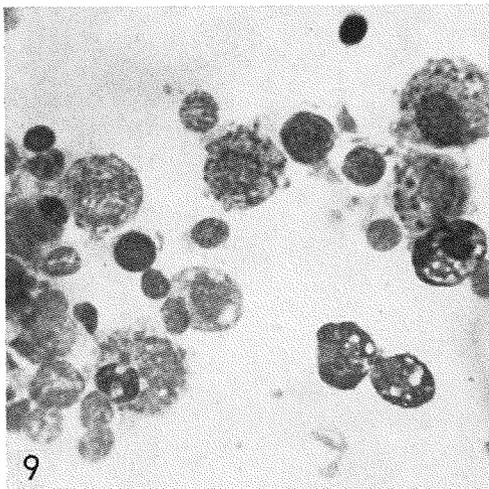
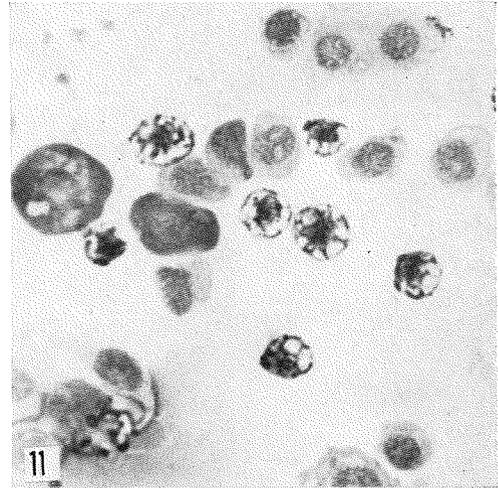
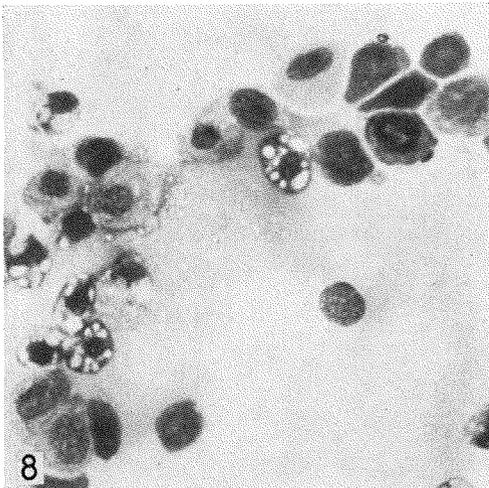
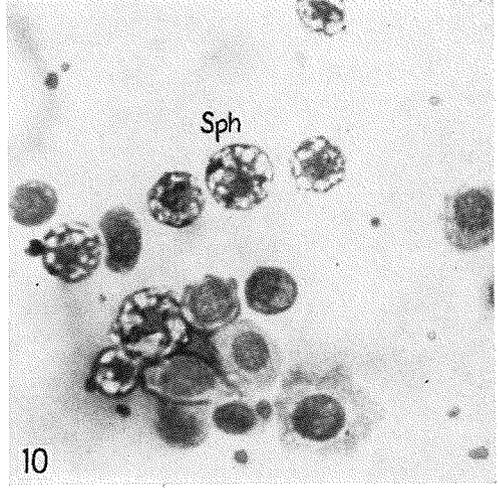
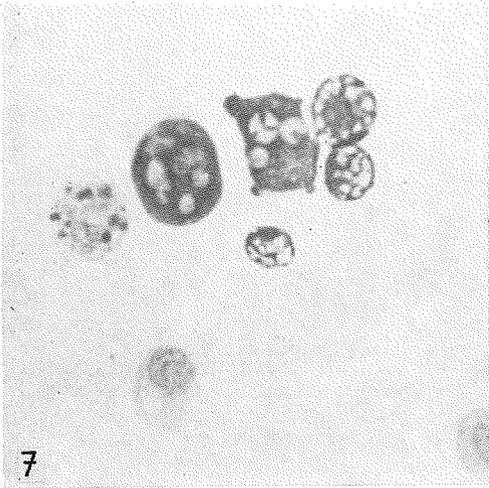


Fig. 7-12

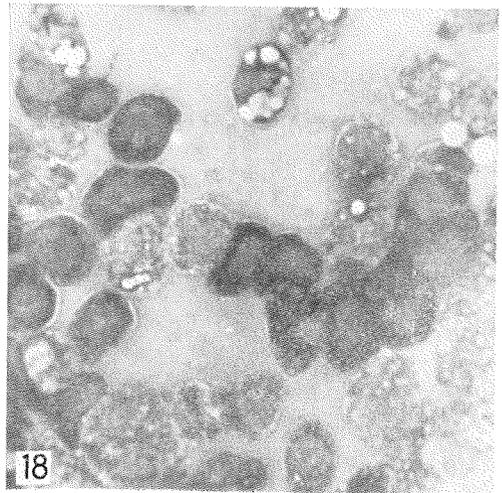
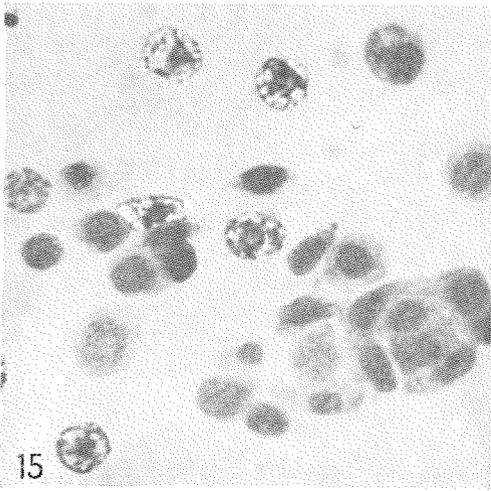
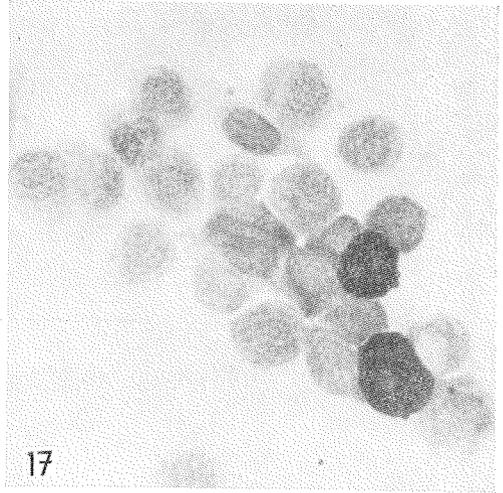
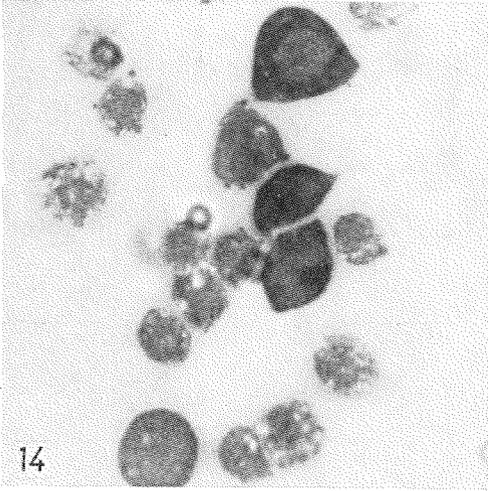
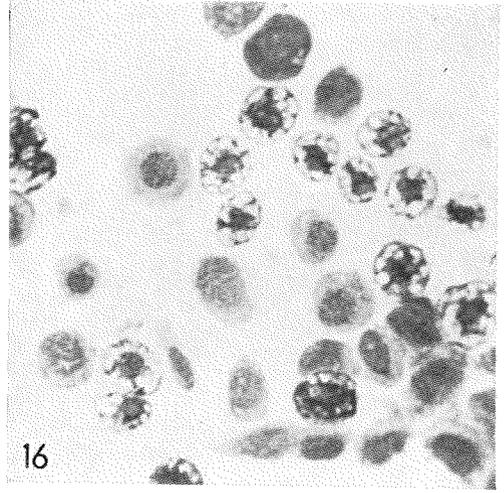
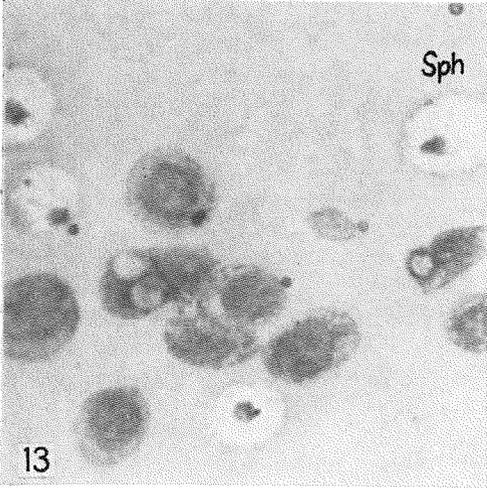


Fig. 13—18

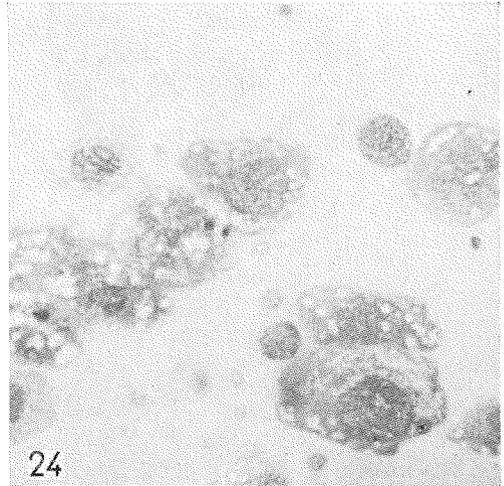
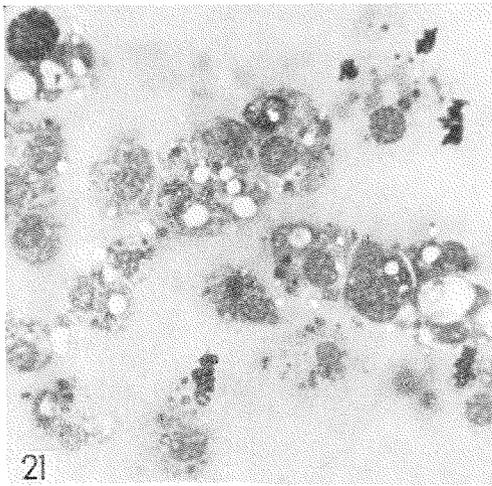
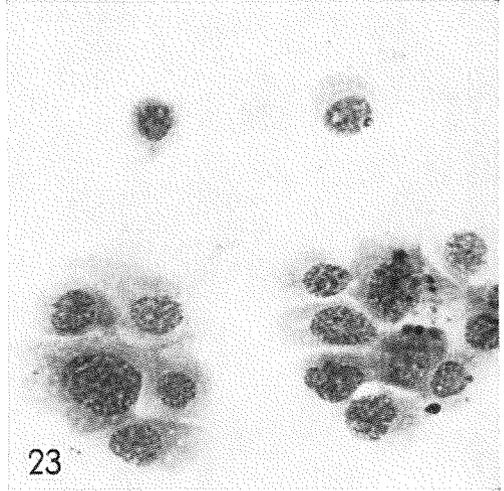
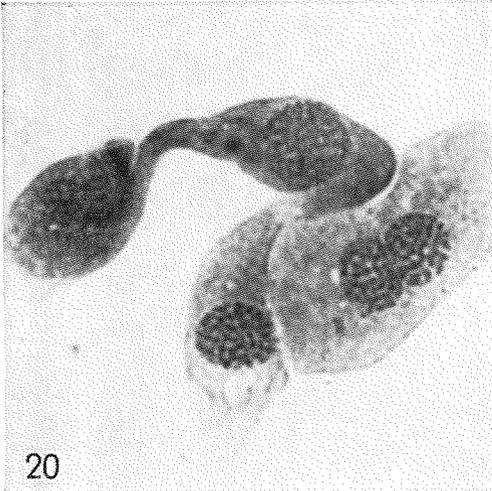
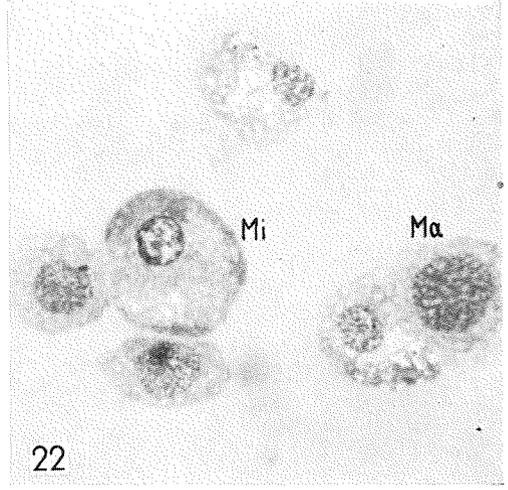
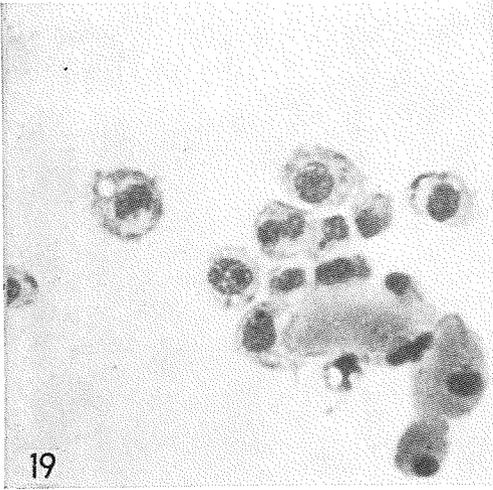


Fig. 19-24

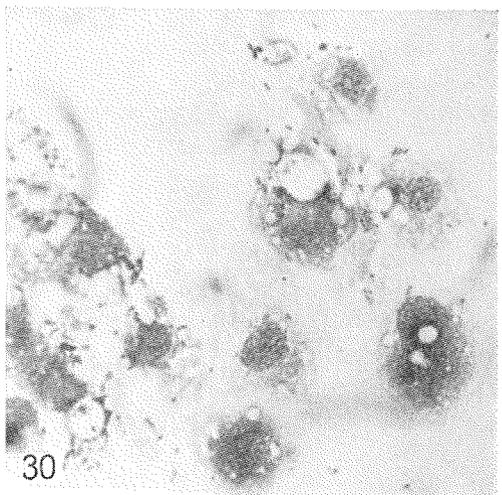
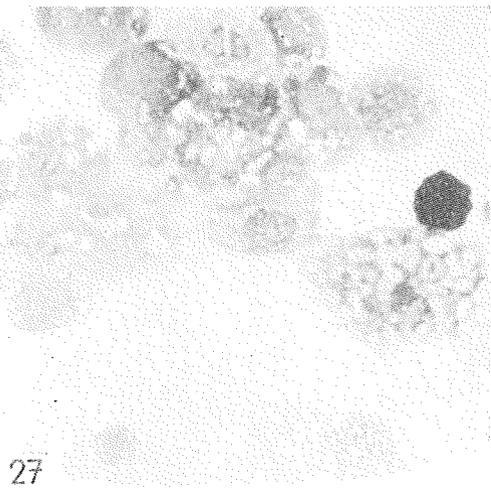
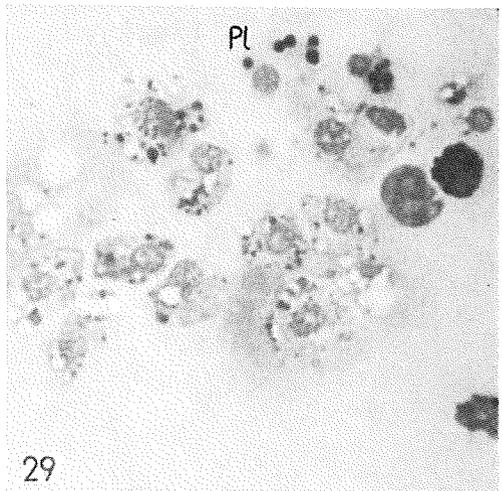
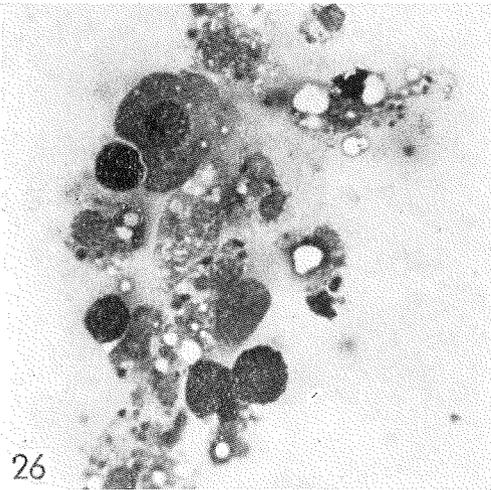
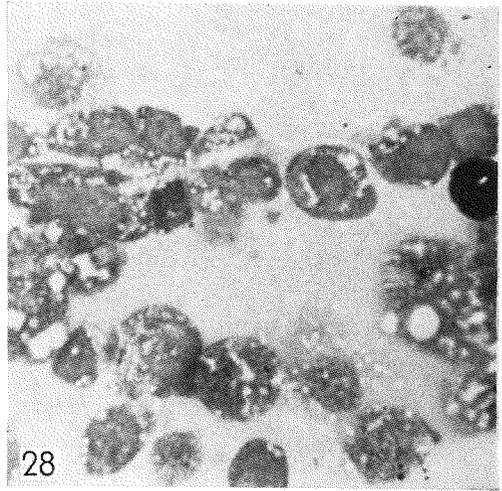
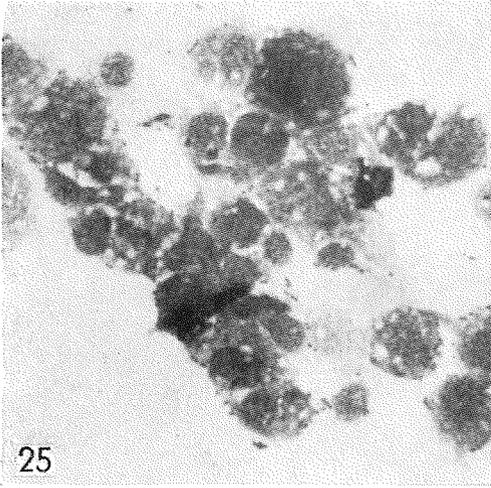


Fig. 25-30

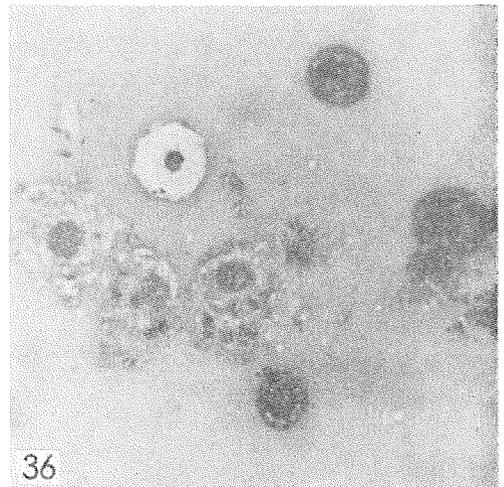
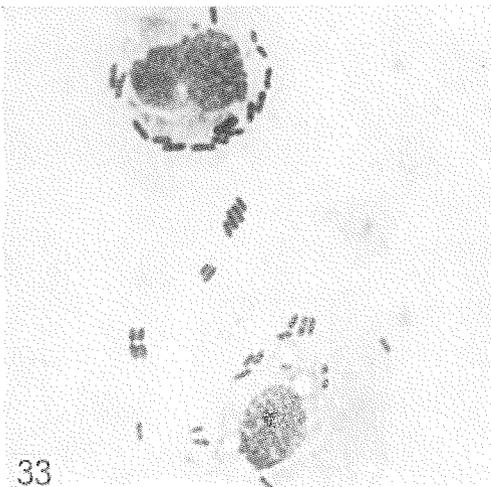
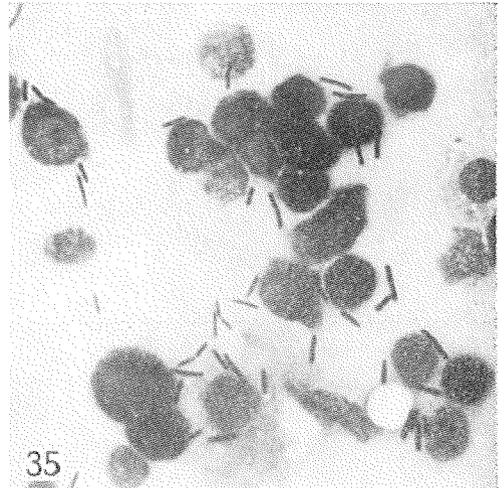
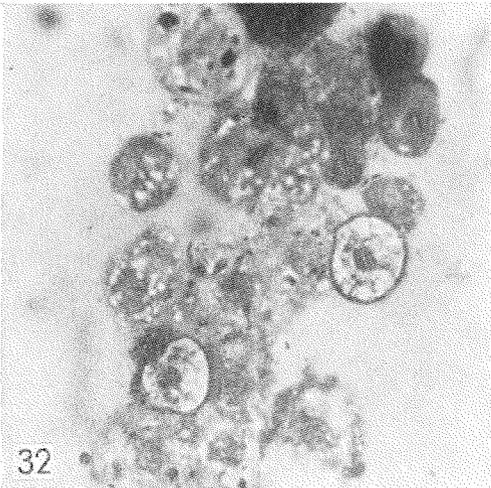
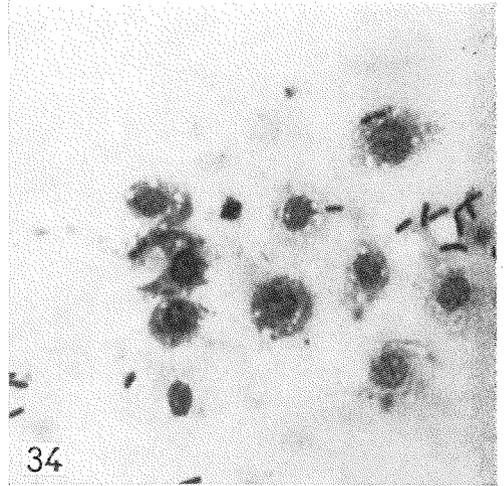
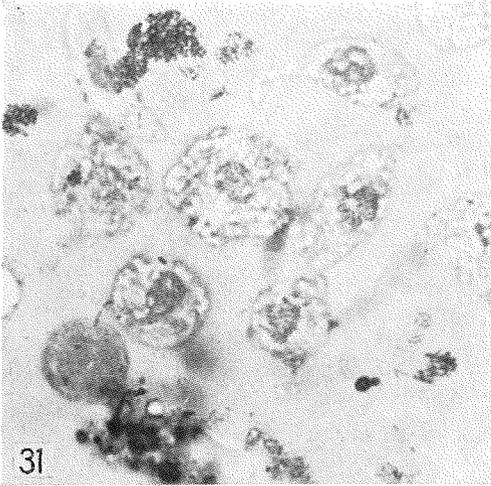


Fig. 31 – 36

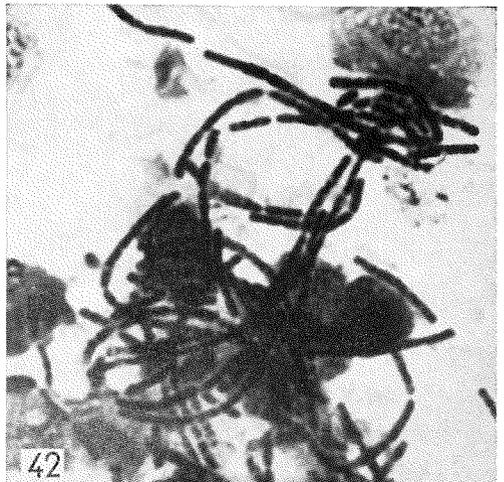
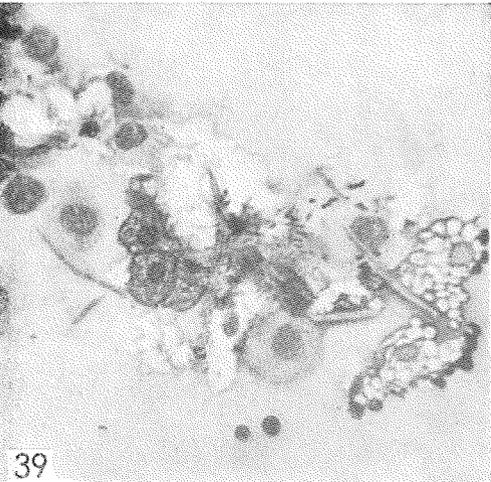
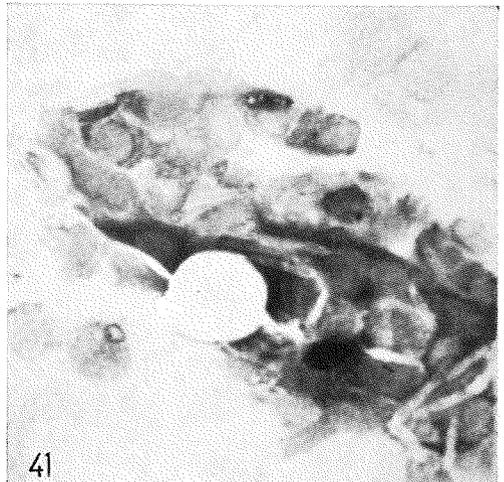
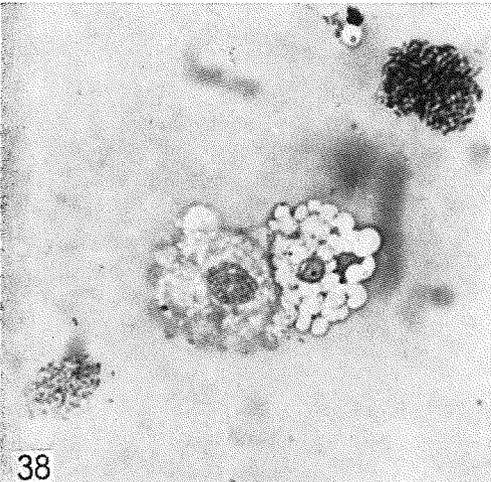
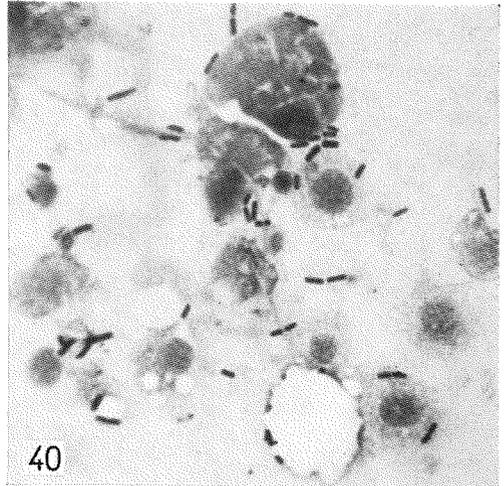
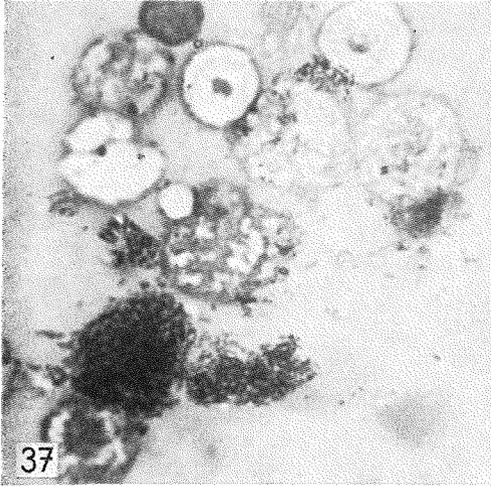


Fig. 37-42

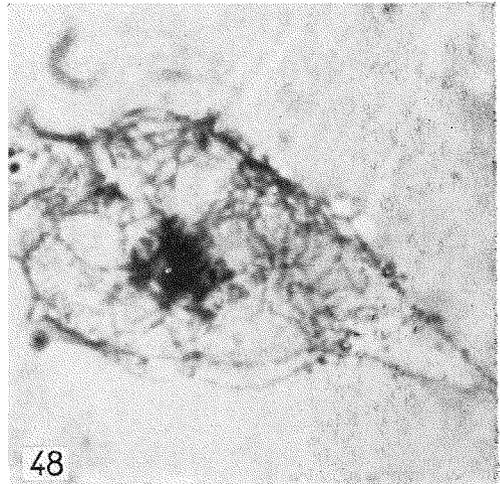
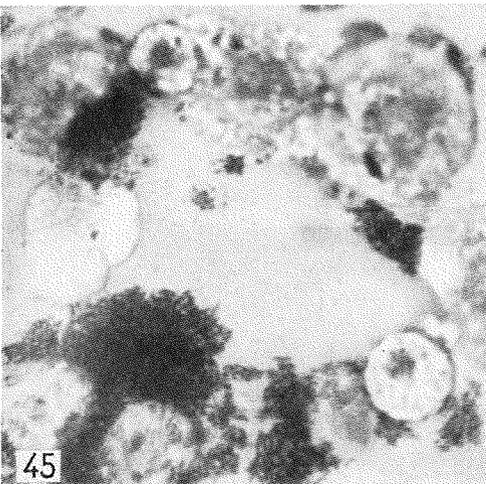
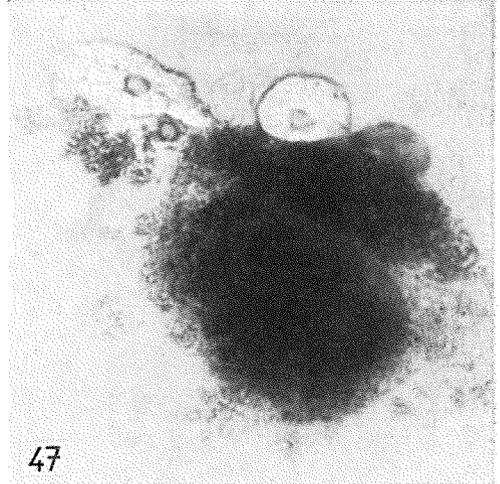
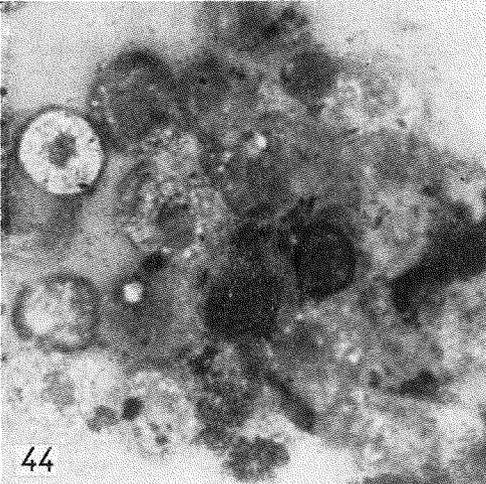
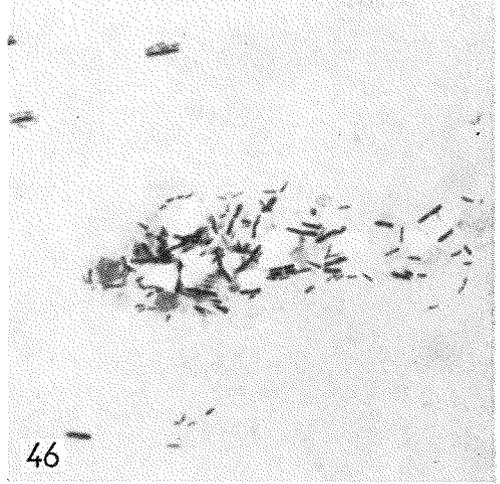
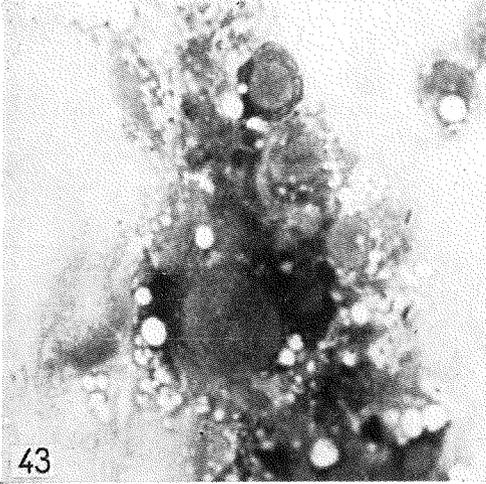


Fig. 43-48

2. Die durch *Bacillus thuringiensis* BERLINER-Infektionen in der Hämolymphe von Kiefernspanner-Raupen hervorgerufenen pathologischen Veränderungen

Gruppe 0 bis I

Fig. 13—16. Raupe kurz nach der Häutung zum II. Stadium, Blutbild etwa sechs Stunden nach erfolgter Infektion. Die ersten atypischen Erscheinungen sind in der Regel an der Vielzahl von auffällig vakuolisierten Sphaerulazellen und den stark hypertrophierten Mikronucleocyten zu erkennen; obwohl vielfach eine sichere Entscheidung schwierig ist, da ähnliche Situationen auch während der Häutungsphasen auftreten

Fig. 17. Gleichzeitig treten basophile Makronucleocyten auf, die eine auffällige Affinität zu roten Farbstoffen haben

Fig. 18. Sie zeigt ein typisches Blutbild etwa 8—14 Stunden nach erfolgter Infektion. Vorwiegend die Mikro- und Makronucleocyten zeigen charakteristische Veränderungen

Fig. 19—24. Die Hypertrophie, besonders von Mikro- und Makronucleocyten führt zu erstaunlichen Extremen. Deutlich sind bereits beginnende Degenerationserscheinungen erkennbar

Fig. 21, 24. Die anfänglich nur auf einen Teil der Hämocyten beschränkten Veränderungen haben auf fast sämtliche Hämocyten übergegriffen. Es sind nur sehr selten noch intakte Zellen anzutreffen

Gruppe II

Fig. 25, 26. Fortgeschrittenes Stadium der Infektion. Neben degenerierenden Hämocytenformen sind in anderen Blutzellen die stark hypertrophierten Kerne auffällig. Fernerhin sind zahlreiche, kleine, stark rot gefärbte, strukturlose Kügelchen sichtbar, die unter Umständen als von der Hämolymphe lokalisierte Endotoxine zu deuten sind

Fig. 27. In dieser Abbildung sind die stark vakuolisierten Mikronucleocyten besonders deutlich sichtbar (vergleiche auch Fig. 31)

Fig. 28, 29. Zahlreiche veränderte Plasmatoocyten und Makronucleocyten (eine sichere Determination der Hämocytentypen ist allerdings schwierig)

Fig. 30. In diesem Blutbild sind vereinzelt Gruppen von Bakteriensporen sichtbar; es hat häufig den Anschein, als wenn diese von den Hämocyten phagozytiert werden, jedoch ist eine sichere Entscheidung schwer möglich, da es sich auch um eine einfache Anlagerung handeln kann

Fig. 31, 32. Die rasch zunehmende Zahl an Bakterien, besonders der vegetativen Stadien in der Hämolymphe zieht weitere augenfällige Veränderungen in den Hämocyten nach sich, die in den Abbildungen deutlich sichtbar sind

Fig. 33—36. Mit der zunehmenden Überschwemmung der Hämolymphe mit Bakterien treten vereinzelt sogenannte „Hämocytenaggregationen“ auf, die aus degenerierenden Blutzellen bestehen. Vereinzelt sind Kettenbildungen der vegetativen Bakterienformen zu beobachten. Das neuerliche Auftreten stark färbbarer Makronucleocyten (Fig. 35) ist möglicherweise auf eine Exotoxinbildung zurückzuführen

Gruppe III

Fig. 37, 38. Obwohl laufend junge indifferente Hämocyten in die Hämolymphe gelangen, ist auf Grund des fortgeschrittenen Stadiums der Infektion an eine erfolgreiche Abwehrreaktion des Raupenorganismus nicht mehr zu denken

Fig. 39—42. In den Blutbildern treten fast ausnahmslos nur noch bereits degenerierte Hämocyten auf

Gruppe IV

Fig. 43 —48. In den Blutbildern sind fast nur noch Hämocyten-Aggregationen und undefinierbare Konglomeratbildungen zu erkennen, die aus degenerierten Blutelementen bestehen