

Untersuchungen zum kombinierten Einsatz von
Metarhizium anisopliae und niedrig dosierten insektiziden/akariziden
Wirkstoffen auf die Zecken *Amblyomma hebraeum*,
Rhipicephalus sanguineus und *Rhipicephalus microplus*

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades

Doktorin der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Diplom Biologin Verona Ingrid Schumacher geb. Kuchenbuch
geboren am 12.07.1982 in Hannover

2013

Referent: Prof. Dr. Hans-Michael Poehling

Koreferent: Prof. Dr. Dieter Steinhagen

Tag der Promotion: 25.02.2013

Allgemeine Zusammenfassung

Zecken parasitieren an Tieren und Menschen und dienen als Vektor für verschiedene Krankheitserreger. Ihr Stich kann allergische Reaktionen verursachen und Sekundärinfektionen begünstigen. Starker Zeckenbefall bei Nutztieren kann zu enormen finanziellen Einbußen führen. Aufgrund von zunehmenden Problemen mit chemischen Ektoparasitiziden (u. a. Resistenzen und Kontaminationen von Tier und Umwelt) wird zunehmend nach biologischen Alternativen gesucht. Eine dieser Alternativen wären entomopathogene Pilze (z. B. *Metarhizium anisopliae*) aufgrund ihrer geringen Wirkung auf Nicht-Zielorganismen und ihrem Potenzial, sich sekundär in einer infizierten Population von Zielorganismen auszubreiten (Epizootie). Eine verlässliche Wirksamkeit ist für den Einsatz als Zeckenbekämpfungsmittel unverzichtbar. Diese ist bei entomopathogenen Pilzen jedoch abhängig von Umweltbedingungen, der Kutikulabeschaffenheit und von Immunreaktionen der Zielorganismen. Zur Erhöhung der Wirksamkeit ist es möglich, *M. anisopliae* kombiniert mit niedrig dosierten chemischen Schädlingsbekämpfungsmitteln zu applizieren. Diese sollen die Immunantwort der Zecken unterdrücken oder ihr Verhalten verändern und somit eine Pilzinfektion begünstigen. Die positiven Effekte kommen aber nur zum Tragen, wenn das Schädlingsbekämpfungsmittel die Entwicklung, Virulenz und das sekundäre Verbreitungspotenzial des Pilzes nicht negativ beeinflusst.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der konzentrationsabhängige Einfluss der Schädlingsbekämpfungsmittel Fipronil, Permethrin, Imidacloprid, NeemAzal[®], Amitraz und Etoxazol auf Keimung, Wachstum und Sporulation zweier Pilzstämme von *M. anisopliae* (MA-K und MA-7) *in vitro* untersucht. Dazu wurde *M. anisopliae* auf mit Hefe und Pepton angereichertem Kartoffel-Dextrose-Agar, der mit verschiedenen Konzentrationen der Schädlingsbekämpfungsmittel versetzt wurde, inokuliert. Keimrate, Myzelwachstum und Sporulation wurden evaluiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die getesteten Schädlingsbekämpfungsmittel gemäß einer Klassifizierung nach Alves *et al.* (1998), die Myzelwachstum und Sporulation berücksichtigt, mit beiden getesteten Stämmen von *M. anisopliae* kompatibel sind. Nur die höheren Konzentrationen von Fipronil (40 und 200 ppm) und Etoxazol (20 und 100 ppm) mussten gegenüber einem der getesteten *M. anisopliae*-Stämme (MA-7) als moderat toxisch bzw. toxisch (100 ppm Etoxazol) eingestuft werden. Da nur die hohen Konzentrationen der Wirkstoffe eine leichte Hemmung der Keimung und des Koloniewachstums und eine etwas stärkere Hemmung der Sporulation (maximal um 63 %) hervorriefen, ist es möglich, die Schädlingsbekämpfungsmittel in geringen Konzentrationen kombiniert mit MA-K und MA-7 anzuwenden.

In einem nächsten Schritt wurde die Empfindlichkeit von verschiedenen Zeckenarten und -stadien auf ausgewählte Schädlingsbekämpfungsmittel und die beiden Pilzstämme *in vitro* untersucht. Getestet wurden *Rhipicephalus sanguineus* (ungesogene Adulte), *Amblyomma hebraeum* (vollgesogene Nymphen und ungesogene Adulte) sowie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Eier, ungesogene Larven und vollgesogene Weibchen). Zunächst wurden LC₅₀-Werte für die Schädlingsbekämpfungsmittel und für die *M. anisopliae*-Stämme ermittelt. Die Stadien wurden dazu mittels einer Tauchmethode mit verschiedenen Wirkstoffen behandelt und anschließend für 14 bis 35 Tage (Adulte), 63 Tage (Nymphen), 14 bis 28 Tage (Larven) oder 42 Tage (Eier) in Petrischalen/Gläschen inkubiert und evaluiert. Die ermittelten subletalen Konzentrationen von den Schädlingsbekämpfungsmitteln und *M. anisopliae* wurden in einem weiteren Schritt kombiniert angewendet und die Mortalität wurde dabei über die oben genannten Zeiträume bestimmt.

Grundsätzlich waren die Auswirkungen der Kombinationsbehandlungen von der Art und dem Entwicklungsstand der Zecke abhängig. Mit Ausnahme von Etoxazol erzielten die höheren Konzentrationen von *M. anisopliae* in Kombination mit den höheren Schädlingsbekämpfungsmittel-Konzentrationen vermehrt additive und synergistische Effekte in Bezug auf die Mortalität. Ob die niedrige Konzentration eines Schädlingsbekämpfungsmittels mit der höheren von *M. anisopliae* oder die höhere Konzentration eines Schädlingsbekämpfungsmittels mit der niedrigeren Konzentration von *M. anisopliae* kombiniert wurde, machte für die Anzahl der auftretenden additiven und synergistischen Effekte keinen Unterschied. Die geringste Wirksamkeit erzielten die Kombinationen aus den geringen Konzentrationen von *M. anisopliae* und Schädlingsbekämpfungsmittel. Grundsätzlich wurde das Auftreten von Effekten bei Behandlung mit hohen Konidien-Konzentrationen (ab $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml) stärker begünstigt und es trat in einigen Fällen auch eine Wirkbeschleunigung von *M. anisopliae* ein.

Bei Versuchen mit dem Chitinsyntheseinhibitor Etoxazol waren die Kombinationen mit der höheren Etoxazol-Konzentration antagonistisch, während sich für alle Kombinationen mit niedrigerem Etoxazol-Gehalt additive Effekte nachweisen ließen.

In den Versuchen mit Larven von *R. microplus* wurden für keine der Kombinationen mit Amitraz, Permethrin oder Imidacloprid Effekte nachgewiesen, was auf einen Optimierungsbedarf des Testsystems schließen lässt. Aufgrund der zu niedrigen Konidien-Konzentration bei den Versuchen mit Eiern von *R. microplus* konnte keine Wirkung festgestellt werden, so dass keine Aussagen über die Wirksamkeit der kombinierten Anwendung mit Fipronil, Amitraz oder Permethrin getroffen werden konnte.

Eine kombinierte Anwendung von *M. anisopliae* und Fipronil (oder Amitraz) gegen *R. sanguineus*, *A. hebraeum* und *R. microplus* ist in ausgewählten Kombinationen in der Lage, die Pathogenität des Pilzes durch Herabsetzen der Immunantwort zu verbessern. Es sollten allerdings weitere Studien zur Stabilisierung der Wirkungssicherheit durchgeführt werden. Eine kombinierte Anwendung von Etoxazol mit niedrigen Konzentrationen von *M. anisopliae* ist auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse nur eingeschränkt erfolgversprechend.

Keywords: *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma hebraeum*, *Metarhizium anisopliae*, niedrig dosierte Schädlingsbekämpfungsmittel, additive und synergistische Effekte, biologische Zeckenkontrolle

General summary

Ticks are pests of animals and humans, and they can vector several pathogens. Their bites may cause allergic reactions and favour secondary infections. When tick infestations of livestock are high, they can cause considerable economic losses. Due to increasing problems with the use of conventional pesticides (*e.g.* contamination of host animals or the environment, as well as resistance in the pest), there is a high demand for alternative biological control measures. Entomopathogenic fungi (*e.g.* *Metarhizium anisopliae*) are one group of promising biological agents. Their advantage compared to chemical pesticides is the reduced effect on non-target organisms. In comparison to other biocontrol agents, they actively penetrate the host and spread secondarily in target populations leading to persistent control. Consistent efficacy will be required if biological control of ticks is to be accepted in practical management strategies. However, the efficacy of entomopathogenic fungi can vary depending on the environmental conditions, and it is also affected by the host's cuticle and immune response. It was hypothesised for this study that efficacy of *M. anisopliae* could be enhanced by combining the application of fungi with low doses of either chemical or biological pesticides. On the one hand, the sublethal dose of pesticide could reduce the intrinsic (immunological) defence or change the behaviour of ticks and thus increase the chance of infection by fungal spores. On the other hand, a pesticide should be chosen that does not negatively affect the development, virulence or secondary cycling of the fungi.

This study initially investigated the dose-dependent influence of the pesticides fipronil, permethrin, imidacloprid, NeemAzal[®], amitraz and etoxazole on germination, vegetative growth and sporulation of two strains of *M. anisopliae* (MA-K and MA-7) *in vitro*.

M. anisopliae was inoculated on a medium containing potato-dextrose-agar, yeast, peptone and different concentrations of pesticides. Germination, vegetative growth and sporulation were evaluated. Results showed compatibility of the pesticides with both fungal strains according to a classification of Alves *et al.* (1998), which considers vegetative growth and sporulation. Only higher dose rates of fipronil (40 and 200 ppm) and etoxazole (20 and 100 ppm) were classified as moderately toxic or toxic (100 ppm etoxazole) for one *M. anisopliae* strain (MA-7).

Furthermore, only the higher concentrations of the other tested pesticides caused a slight inhibition of conidial germination, of colony size and a higher reduction of sporulation (at most 63%). Therefore, in principle it is possible to use the tested pesticides in combination with MA-K and MA-7.

In a second step, the susceptibility of several different tick species and developmental stages to selected pesticides and entomopathogenic fungi was tested *in vitro*. The following ticks were tested: *Rhipicephalus sanguineus* (unfed adults), *Amblyomma hebraeum* (engorged nymphs and unfed adults), and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (eggs, unfed larvae and engorged females). LC₅₀-values were calculated for the pesticides, and the efficacy of *M. anisopliae* strains was evaluated in relation to the concentrations of applied conidial suspensions. The test organisms were dipped in suspensions of the active agents (pesticides or fungi), subsequently put in petri dishes or glasses, incubated and monitored for mortality until the following time points: 14 to 35 days (adults), 63 days (nymphs), 14 to 28 days (larvae) or 42 days (eggs). Finally, selected concentrations of pesticides and *M. anisopliae* conidia suspensions were combined, and mortality was evaluated as mentioned above.

The effects of combined applications were dependent on both the species and developmental stage of the ticks. Regarding mortality, additive and synergistic effects could be obtained most frequently after the combined application of the higher conidial concentrations of *M. anisopliae* with the higher doses of pesticides, except for etoxazole.

There was no preferential occurrence of either synergistic or additive effects in relation to any kind of combination, either low conidial concentration of *M. anisopliae* with higher doses of pesticides, or vice versa.

Combinations of low concentrations of both *M. anisopliae* and pesticide caused the least effects on mortality. Essentially, synergistic or additive effects occurred more frequently in treatments with higher conidial concentrations (1.0×10^6 conidia/ml or more), and in some cases an acceleration of the infection process of *M. anisopliae* could be observed.

Combinations with the higher concentration of the chitin-synthesis inhibitor etoxazole were antagonistic to the effects of the *M. anisopliae* strain, but all combinations with lower doses of etoxazole showed additive effects on mortality. No additive or synergistic effects could be detected in combined applications of fungi and amitraz, permethrin or imidacloprid against larvae of *R. microplus*. These results might be the consequence of a suboptimal test system in terms of humidity control. The conidial concentrations in tests against eggs of *R. microplus*, for example, were too low, and hence no effects could be detected and no conclusion can be drawn about combined applications with fipronil, amitraz or permethrin.

In conclusion, the results were promising and it is possible to enhance the pathogenicity of the fungi by reducing the immune response of *R. sanguineus*, *A. hebraeum* and *R. microplus* through combined application with fipronil or amitraz. A combined application of etoxazole

with low conidial concentrations of *M. anisopliae* however can be recommended only to a limited extent as demonstrated in the trial results.

Keywords: *Rhipicephalus microplus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma hebraeum*, *Metarhizium anisopliae*, low doses of pesticides, additive and synergistic effects, biological tick control

Inhaltsverzeichnis

Allgemeine Zusammenfassung.....	I
General summary	IV
Inhaltsverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	XIV
Allgemeine Einleitung	1
Zecken	1
Die Bekämpfung von Zecken.....	5
Kontrolle mit natürlichen und synthetischen Schädlingsbekämpfungsmitteln	5
Biologische Kontrolle mit entomopathogenen Pilzen.....	10
Ziel der Arbeit	13
Kapitel 1: <i>In vitro</i> Wirkung von Schädlingsbekämpfungsmitteln auf Keimung, vegetatives Wachstum und Konidienproduktion zweier Stämme von <i>Metarhizium anisopliae</i>	15
1.1 Einleitung	16
1.2 Material und Methoden	17
1.2.1 Schädlingsbekämpfungsmittel	17
1.2.2 Entomopathogene Pilze.....	18
1.2.3 Keimung.....	19
1.2.4 Vegetatives Wachstum und Konidienproduktion	19
1.2.5 Berechnung der Kompatibilität	20
1.2.6 Statistik.....	20
1.3 Ergebnisse	20
1.3.1 Dimethylsulfoxid.....	20
1.3.2 NeemAzal.....	21
1.3.3 Permethrin	25
1.3.4 Imidacloprid	25
1.3.5 Kombination von Permethrin und Imidacloprid	28
1.3.6 Fipronil.....	28
1.3.7 Amitraz.....	31
1.3.8 Etoxazol.....	31
1.4 Diskussion	32

1.4.1 Dimethylsulfoxid.....	35
1.4.2 NeemAzal.....	36
1.4.3 Permethrin	37
1.4.4 Imidacloprid	37
1.4.5 Kombination von Permethrin und Imidacloprid	38
1.4.6 Fipronil.....	38
1.4.7 Amitraz.....	39
1.4.8 Etoxazol.....	39
1.4.9 Fazit.....	40
Kapitel 2: Wirkung von <i>Metarhizium anisopliae</i> in Kombination mit Fipronil oder Etoxazol auf vollgesogene Nymphen und ungesogene Adulte von <i>Amblyomma hebraeum</i>	41
Zusammenfassung.....	41
2.1 Einleitung	43
2.2 Material und Methoden	45
2.2.1 Handhabung der Zecken.....	45
2.2.2 Ermittlung der subletalen Konzentrationen von Etoxazol und Fipronil	46
2.2.3 Ermittlung der konzentrationsabhängigen Wirkungsgrade von MA-K und MA-7	46
2.2.4 Versuche mit den Kombinationen aus <i>M. anisopliae</i> und Fipronil/Etoxazol	47
2.2.5 Behandlung und Inkubation	47
2.2.6 Statistik.....	48
2.3 Ergebnisse	50
2.3.1 Ermittlung der subletalen Konzentrationen von Etoxazol und Fipronil	50
2.3.1.1 Vollgesogene Nymphen	50
2.3.1.1.1 Etoxazol	50
2.3.1.1.2 Fipronil	50
2.3.1.2 Ungesogene Adulte – Fipronil	51
2.3.2 Ermittlung der konzentrationsabhängigen Wirkungsgrade von MA-K und MA-7	52
2.3.2.1 Nymphen	52
2.3.2.2 Ungesogene Adulte	54
2.3.3 Versuche mit den Kombinationen aus <i>M. anisopliae</i> und Fipronil/Etoxazol	56
2.3.3.1 Vollgesogene Nymphen	56
2.3.3.1.1 <i>M. anisopliae</i> und Etoxazol	56
2.3.3.1.1.1 MA-K und Etoxazol.....	56

2.3.3.1.1.2 MA-7 und Etoxazol.....	58
2.3.3.1.1.3 Schlupf zu Adulten	59
2.3.3.1.1.4 Gesamtmortalität.....	60
2.3.3.1.2 <i>M. anisopliae</i> und Fipronil	64
2.3.3.1.2.1 MA-K und Fipronil	64
2.3.3.1.2.2 MA-7 und Fipronil.....	65
2.3.3.1.2.3 Schlupf zu den Adulten.....	67
2.3.3.1.2.4 Gesamtmortalität.....	68
2.3.3.2 Ungesogene Adulte	72
2.3.3.2.1 Männchen.....	73
2.3.3.2.1.1 MA-K und Fipronil	73
2.3.3.2.1.2 MA-7 und Fipronil.....	76
2.3.3.2.2 Weibchen	77
2.3.3.2.2.1 MA-K und Fipronil	77
2.3.3.2.2.2 MA-7 und Fipronil.....	78
2.4 Diskussion	80
2.4.1 Subletale Konzentrationen von Etoxazol und Fipronil	80
2.4.2 Konzentrationsabhängige Wirkungsgrade von MA-K und MA-7	82
2.4.3 Kombinationen aus <i>M. anisopliae</i> und Etoxazol oder Fipronil	84
2.4.3.1 Wirkungen der Kombinationen auf Nymphen	84
2.4.3.1.1 Etoxazol	84
2.4.3.1.2 Fipronil	86
2.4.3.1.3 Schlupf der Nymphen zu Adulten	87
2.4.3.2 Wirkungen der Kombinationen auf Adulte	88
2.4.4 Fazit.....	89
Kapitel 3: Additive Effekte der Kombination aus <i>Metarhizium anisopliae</i> und Fipronil auf ungesogene Adulte von <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	90
Zusammenfassung.....	90
3.1 Einleitung	92
3.2 Material und Methoden	94
3.2.1 Handhabung der Zecken.....	94
3.2.2 Ermittlung der subletalen Konzentrationen von Fipronil.....	94
3.2.3 Ermittlung der konzentrationsabhängigen Wirkungsgrade von MA-K und MA-7	94
3.2.4 Versuche mit den Kombinationen aus <i>M. anisopliae</i> und Fipronil.....	95

3.2.5 Behandlung und Inkubation	95
3.2.6 Statistik.....	96
3.3 Ergebnisse	97
3.3.1. Ermittlung der subletalen Konzentrationen von Fipronil.....	97
3.3.2. Ermittlung der konzentrationsabhängigen Wirkungsgrade von MA-K und MA-7	98
3.3.3 Versuche mit den Kombinationen aus <i>M. anisopliae</i> und Fipronil.....	100
3.3.3.1 Männchen	100
3.3.3.1.1 MA-K und Fipronil.....	101
3.3.3.1.2 MA-7 und Fipronil.....	102
3.3.3.2 Weibchen.....	103
3.3.3.2.1 MA-K und Fipronil.....	103
3.3.3.2.2 MA-7 und Fipronil.....	105
3.4 Diskussion	108
3.4.1 Subletale Konzentrationen von Fipronil	108
3.4.2 Konzentrationsabhängige Wirkungsgrade von MA-K und MA-7	109
3.4.3 Kombinationen aus <i>M. anisopliae</i> und Fipronil.....	111
3.4.4 Fazit.....	112
Kapitel 4: Möglichkeiten der Bekämpfung verschiedener Entwicklungsstadien von <i>Rhipicephalus microplus</i> durch Kombinationen von <i>Metarhizium anisopliae</i> und Schädlingsbekämpfungsmitteln	113
Zusammenfassung.....	113
4.1 Einleitung	115
4.2 Material und Methoden	117
4.2.1 Handhabung der Zecken.....	117
4.2.2 Ermittlung der subletalen/subeffektiven Konzentrationen der Schädlings- bekämpfungsmittel.....	117
4.2.3 Ermittlung der konzentrationsabhängigen Wirkungsgrade von MA-K und MA-7	118
4.2.4 Versuche mit den Kombinationen aus <i>M. anisopliae</i> und Schädlings- bekämpfungsmitteln.....	119
4.2.5 Kalibrierkurven	119
4.2.6 Behandlung und Inkubation	122
4.2.6.1 Vollgesogene Weibchen.....	122
4.2.6.2 Eier	122

4.2.6.3 Ungesogene Larven.....	123
4.2.7 Statistik.....	123
4.3 Ergebnisse	125
4.3.1 Ermittlung der subletalen/subeffektiven Konzentrationen der Schädlings- bekämpfungsmittel.....	125
4.3.1.1 Vollgesogene Weibchen.....	125
4.3.1.1.1 Fipronil	125
4.3.1.1.2. Amitraz	126
4.3.1.2 Eier	128
4.3.1.2.1 Fipronil	128
4.3.1.2.2 Amitraz	128
4.3.1.2.3 Permethrin	128
4.3.1.2.4 Imidacloprid.....	130
4.3.1.2.5 NeemAzal	130
4.3.1.3 Ungesogene Larven.....	131
4.3.1.3.1 Fipronil	131
4.3.1.3.2 Amitraz	131
4.3.1.3.3 Permethrin	131
4.3.1.3.4 Imidacloprid.....	133
4.3.1.3.5 NeemAzal	133
4.3.2 Ermittlung der konzentrationsabhängigen Wirkungsgrade von MA-K und MA-7	133
4.3.2.1 Vollgesogene Weibchen.....	133
4.3.2.2 Eier	136
4.3.2.3 Ungesogene Larven.....	137
4.3.3 Versuche mit den Kombinationen aus <i>M. anisopliae</i> und Schädlings- bekämpfungsmitteln	138
4.3.3.1 Vollgesogene Weibchen.....	138
4.3.3.1.1 <i>M. anisopliae</i> und Fipronil	138
4.3.3.1.1.1 Mortalität.....	138
4.3.3.1.1.2 Eiablage.....	139
4.3.3.1.1.2 Schlupfrate	146
4.3.3.1.2 <i>M. anisopliae</i> und Amitraz	148
4.3.3.1.2.1 Mortalität.....	148

4.3.3.1.2.2 Eiablage.....	149
4.3.3.1.2.3 Schlupfrate	155
4.3.3.2 Eier	158
4.3.3.2.1 <i>M. anisopliae</i> und Fipronil	158
4.3.3.2.1.1 MA-K und Fipronil	158
4.3.3.2.1.2 MA-7 und Fipronil	160
4.3.3.2.2 <i>M. anisopliae</i> und Amitraz	161
4.3.3.2.2.1 MA-K und Amitraz	161
4.3.3.2.2.2 MA-7 und Amitraz	162
4.3.3.2.3 <i>M. anisopliae</i> und Permethrin	164
4.3.3.2.3.1 MA-K und Permethrin	164
4.3.3.2.3.2 MA-7 und Permethrin	166
4.3.3.3 Ungesogene Larven.....	167
4.3.3.3.1 <i>M. anisopliae</i> und Fipronil	168
4.3.3.3.1.1 MA-K und Fipronil	168
4.3.3.3.1.2 MA-7 und Fipronil	170
4.3.3.3.2 <i>M. anisopliae</i> und Amitraz	171
4.3.3.3.2.1 MA-K und Amitraz	171
4.3.3.3.2.2 MA-7 und Amitraz	172
4.3.3.3.3 <i>M. anisopliae</i> und Permethrin	174
4.3.3.3.3.1 MA-K und Permethrin	174
4.3.3.3.3.1 MA-7 und Permethrin	175
4.3.3.3.4 <i>M. anisopliae</i> und Imidacloprid.....	177
4.3.3.3.4.1 MA-K und Imidacloprid	177
4.3.3.3.4.2 MA-7 und Imidacloprid	178
4.4 Diskussion	179
4.4.1 Subletale/subeffektive Konzentrationen der Schädlingsbekämpfungsmittel	180
4.4.2 Konzentrationsabhängige Wirkungsgrade von MA-K und MA-7	187
4.4.3 Kombinationen aus <i>M. anisopliae</i> und Schädlingsbekämpfungsmitteln	189
4.4.3.1 Vollgesogene Weibchen.....	189
4.4.3.1.1 <i>M. anisopliae</i> und Fipronil	189
4.4.3.1.2 <i>M. anisopliae</i> und Amitraz	191
4.4.3.2 Eier	193
4.4.3.3 Larven.....	194

4.4.4 Fazit.....	197
Allgemeine Diskussion	198
Kompatibilität.....	199
Subletale Konzentrationen der Schädlingsbekämpfungsmittel	200
Konzentrationen von MA-K und MA-7 mit geringem Wirkungsgrad.....	203
Versuche zu Kombinationen mit MA-K oder MA-7 und Schädlingsbekämpfungsmitteln.....	206
Fazit.....	210
Anhang	212
Die χ^2 -Verteilung.....	212
Literaturverzeichnis.....	213
Erklärung.....	236
Lebenslauf.....	237
Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge	238
Danksagung.....	239

Abkürzungsverzeichnis

Für Größen und Einheiten werden die offiziellen Abkürzungen gebraucht. Geschützte Warennamen werden in dieser Arbeit nicht immer durch das Warenzeichen[®] besonders kenntlich gemacht. Folgende weitere Abkürzungen werden verwendet:

*	signifikant
**	sehr signifikant
***	höchst signifikant
A _E	Anzahl der Eier
A _L	Anzahl der Larven
<i>Aq. dest.</i>	<i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
χ^2	Chiquadrat-Wert
$\chi_{(E)}^2$	Chiquadrat-Wert zur erwarteten Mortalität
CV	Chancenverhältnis
df	degrees of freedom (Freiheitsgrad)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	effective concentration fifty percent (wirksame Konzentration für 50 % der Testorganismen)
EC ₉₅	effective concentration ninety-five percent (wirksame Konzentration für 95 % der Testorganismen)
EST	expressed sequence tag
FI ₉₅	95 % Fiduzialintervall
GABA	<i>gamma</i> -Aminobutyric acid (<i>γ</i> -Amino-buttersäure)
G _E	Gewicht der Eier
G _L	Gewicht der Larven
IRAC	Insecticide Resistance Action Committee
K	kompatibel
KA	Konidienanzahl
LC ₅₀	lethal concentration fifty percent (letale Konzentration für 50 % der Testorganismen)
LC ₉₅	lethal concentration ninety-five percent (letale Konzentration für 95 % der Testorganismen)
M _E	Erwartete Mortalität

M _{Kombi}	Mortalität der Zecken durch die Kombination von <i>Metarhizium anisopliae</i> und Schädlingsbekämpfungsmittel
M _{MA}	Mortalität der Zecken durch <i>Metarhizium anisopliae</i>
M _{SBM}	Mortalität der Zecken durch Schädlingsbekämpfungsmittel
MA-7	<i>Metarhizium anisopliae</i> Stamm 7
MA-K	<i>Metarhizium anisopliae</i> Stamm K
MT	moderat toxisch
\bar{x}	Mittelwert
n	number (Anzahl)
n. s.	nicht signifikant
p	probability (Wahrscheinlichkeit)
PDA	potato-dextrose-agar (Kartoffel-Dextrose-Agar)
RH	relative humidity (relative Luftfeuchtigkeit)
s	Standardabweichung
SR	Schlupfrate
ST	sehr toxisch
T	Tage
T-Wert	Toxizitäts-Wert
TnB	Tage nach Behandlung
Tween	0,05 % Tween [®] 80
UV	Ultraviolett
VW	Vegetatives Wachstum
w/v	weight per volume (Gewicht-Volumen-Verhältnis)
w/w	weight per weight (Gewicht-Gewichts-Verhältnis)

Allgemeine Einleitung

Zecken

Zecken sind Ektoparasiten an vielen Wild- und Nutztieren; sie befallen aber auch Menschen und können viele verschiedene Krankheitserreger (Protozoen, Viren, Bakterien und Pilze) übertragen (Nicholson *et al.* 2009, Jongejan und Uilenberg 2004, Sonenshine 1991). Sie sind weltweit die bedeutendsten Vektoren im Veterinärbereich und die zweitbedeutendsten im Humanbereich. Jährlich erkranken zehntausende Menschen an von Zecken übertragenen Krankheiten (Nicholson *et al.* 2009). Außer der möglichen Gefahr einer Krankheitsübertragung kann der Zeckenstich bereits Toxikosen und allergische Antworten bis hin zu (tödlichen) Paralyse verursachen. Zusätzlich können an den Stichwunden Sekundärinfektionen entstehen (Nicholson *et al.* 2009, Sonenshine 1991). Bei Nutztieren können Zeckenstiche eine Abnahme der Fell- bzw. Lederqualität und damit eine Wertminderung zur Folge haben (Nicholson *et al.* 2009).

Zecken (Acari: Ixodida) lassen sich in drei Familien einteilen, von denen die eine Familie (Nuttalliellidae) nur eine Gattung und Art (*Nuttalliella namaqua*) umfasst, die in Süd- und Ostafrika vorkommt (Nicholson *et al.* 2009). Die zweite Familie Argasidae (Lederzecken) umfasst insgesamt 193 Arten, die zurzeit in 5 Gattungen unterteilt werden, obwohl diese Zuordnung bei 133 Arten noch nicht endgültig ist (Guglielmone *et al.* 2010). Lederzecken sind durch das lederartige Integument und das Fehlen des Schildes gut zu erkennen und werden im Englischen aufgrund des fehlenden Schildes auch als „soft ticks“ bezeichnet (Sonenshine 1991). Als Wirte dienen ihnen vornehmlich Vögel und Fledermäuse (Nicholson *et al.* 2009). Alle Stadien der Lederzecken saugen mehrmals Blut (überwiegend nachts). Die Aufenthaltsdauer auf dem Wirt beträgt bei Adulten meist nur 30 Minuten, wohingegen Larven bis zu 10 Tage auf dem Wirt bleiben (Mehlhorn und Mehlhorn 1996). Lederzecken haben mehrere Nymphenstadien (Nicholson *et al.* 2009).

Die artenreichste Familie ist die der Ixodidae (Schildzecken) mit 14 Gattungen (2 davon fossil) und 702 Arten (Guglielmone *et al.* 2010). Schildzecken besitzen ein ausgeprägtes Schild, welches bei Männchen den ganzen Rücken, bei Weibchen den halben Rücken bedeckt. Wegen des Schildes werden sie im Englischen auch „hard ticks“ genannt (Nicholson *et al.* 2009). Alle Stadien saugen langsam über mehrere Tage Blut. Um die enormen Mengen Blut aufnehmen zu können, wird während des Saugaktes Kutikula neu gebildet (Sonenshine 1991).

Ixodes ist mit 243 Arten die größte Gattung (Guglielmone *et al.* 2010). Diese Gattung ist weltweit verbreitet und zu ihr gehören Arten, die bedeutende Humanpathogene übertragen

(Nicholson *et al.* 2009). Weitere Gattungen sind: *Dermacentor* (33 Arten), *Hyalomma* (27 Arten) sowie *Amblyomma* (130 Arten) und *Rhipicephalus* (82 Arten) (Guglielmone *et al.* 2010).

Die Gattung *Amblyomma* ist ebenfalls weltweit verbreitet (Nicholson *et al.* 2009) und umfasst mit mittelgroßen bis großen Adulten die größten Zeckenarten der Ixodidae (Sonenshine 1991). Charakteristisch sind das meist verzierte Schild und die ungewöhnlich langen Mundwerkzeuge (Nicholson *et al.* 2009, Sonenshine 1991). Als Wirte nutzen *Amblyomma* alle Landvertebraten, wobei Amphibien sehr selten befallen werden. *Amblyomma* kommt in feucht-tropischen bis subtropischen Regionen vor (Nicholson *et al.* 2009).

Die Gattung *Rhipicephalus* umfasst 80 Arten und ist auf der ganzen Welt verbreitet. *Rhipicephalus* ist meist an Säugern zu finden, die Larven und Nymphen suchen sich seltener auch Reptilien oder Vögel als Wirte aus (Nicholson *et al.* 2009).

Ixodidae haben vier Entwicklungsstadien: Ei, Larve, Nymphe (nur ein Nymphenstadium) und Adulte. Die Larven haben drei Beinpaare, während die Nymphen und Adulten vier Beinpaare aufweisen (Nicholson *et al.* 2009). Bei den Adulten gibt es einen Geschlechterdimorphismus, jedoch nicht bei Larven und Nymphen (Sonenshine 1991). Mehr als 90 % ihres Lebens verbringen Zecken abseits vom Wirt in geschützten Mikrohabitaten am Boden, im Laub oder in Wirtsnestern. Da Zecken obligate Ektoparasiten sind, nehmen einige oder mehrere Stadien während ihres Lebenszyklus Blut auf (Nicholson *et al.* 2009). Die Dauer bis zur Vollendung des Lebenszyklus ist von Art zu Art leicht unterschiedlich, klimaabhängig und wird von der Wirtsfindung mitbestimmt (Mehlhorn und Piekarski 2002). In den Tropen mit regelmäßigem Niederschlag ist die Entwicklung kurz und es können mehrere Generationen im Jahr aufeinander folgen. In Zonen mit längeren Trockenperioden verlängert sich die Generationszeit, da Zecken in Trockenperioden keine Wirtssuche unternehmen. Auch in gemäßigten bis subarktischen Zonen verlängert sich die Generationszeit infolge der Diapause, in die Zecken bei niedrigen Temperaturen gehen. Für eine dreiwirtige Zecke ist es unter idealen Bedingungen möglich, eine Generation innerhalb eines Jahres zu beenden. Die Entwicklung kann sich aber bei widrigen Umweltbedingungen auf zwei oder mehr Jahre verlängern (Nicholson *et al.* 2009). Einige ixodide Zecken können mehrere Jahre ohne Blutmahlzeit überleben (Mehlhorn und Piekarski 2002). Somit haben Zecken für blutsaugende Parasiten eine verhältnismäßig lange Lebenszeit. Blutsaugende Mücken haben beispielsweise eine Generationszeit zwischen neun Tagen und neun Wochen (Mehlhorn und Piekarski 2002). Bei mehr als 90 % der Ixodidae gestaltet sich der Lebenszyklus nach Nicholson *et al.* (2009) wie folgt: Nach dem Schlupf aus einem Ei begibt sich die ungesogene

Larve auf Wirtsfindung, saugt Blut, löst sich vom Wirt und entwickelt sich in einem geschützten Mikrolebensraum zu einer Nymphe. Die frischgeschlüpfte Nymphe macht sich ebenfalls auf die Suche nach einem Wirt und entwickelt sich nach vollendetem Saugakt und Abfallen vom Wirt in einem geschützten Mikrohabitat zur adulten Zecke. Die Adulten suchen einen Wirt auf, paaren sich auf diesem, saugen Blut und die vollgesogenen Weibchen verlassen den Wirt anschließend. Männchen verbleiben meist auf dem Wirt, saugen mehrmals Blut und paaren sich mit verschiedenen Weibchen (Nicholson *et al.* 2009, Sonenshine 1991). Eine Ausnahme hiervon bilden Männchen einiger *Ixodes* Arten, die keine Blutmahlzeit zu sich nehmen (Nicholson *et al.* 2009). Die Eier werden von den vollgesogenen Weibchen an einem geschützten Ort als kontinuierliches Eipaket gelegt. Das Weibchen stirbt nach Abschluss der Eiablage (Sonenshine 1991). Es können von einer ixodiden Zecke 100 bis mehrere 1000 Eier abgelegt werden, wobei das bislang dokumentierte Maximum bei 34.000 Eiern (*Amblyomma variegatum*) liegt (Nicholson *et al.* 2009).

Zecken werden nach der Anzahl ihrer Wirte in dreiwirtige, zweiwirtige oder einwirtige Zecken eingeteilt (Sonenshine 1991). Circa 90 % der Ixodidae sind dreiwirtige Zecken (Nicholson *et al.* 2009). Bei diesen sucht jedes Stadium einen neuen Wirt auf. Bei zweiwirtigen Zecken saugen zwei Stadien auf einem Wirt und auch die Häutung von dem einen zu dem anderen Stadium erfolgt auf dem Wirt. Zu den zweiwirtigen Zecken zählt beispielsweise *Hyalomma [anatolicum] excavatum*, deren gesogene Larven sich auf dem Wirt häuten und deren daraus geschlüpfte Nymphen direkt wieder an dem Wirt saugen um ihn dann vollgesogen zu verlassen (Sonenshine 1991). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini, 1887 (Acari: Ixodidae) ist ein Beispiel für eine der wenigen einwirtigen Zecken. Diese befallen den Wirt als ungesogene Larven und verlassen ihn erst als vollgesogene Weibchen (Nicholson *et al.* 2009). Die meisten Zeckenarten sind euryxen, d. h. sie können viele verschiedene Wirtsarten befallen. Arten, die sich hingegen auf wenige Wirtsarten spezialisiert haben, werden als stenoxen bezeichnet (Eckert *et al.* 2008).

Je nach Zeckenart oder –stadium wird eine von zwei verschiedenen Strategien zur Wirtsfindung angewendet. Die meisten Zeckenarten lauern einem geeigneten Wirt in ihrem Habitat auf (im Englischen „ambush strategy“) und heften sich an diesen, sobald es zum Kontakt kommt. Einige wenige Arten (u. a. Adulte von *Amblyomma*) suchen hingegen aktiv nach einem geeigneten Wirt (im Englischen „hunter“). Hierbei lokalisieren die Zecken ihre Wirte auf einige Entfernung und laufen gezielt auf sie zu (Eckert *et al.* 2008, Sonenshine 1993). Zur Wahrnehmung von Wirten strecken die Zecken das erste Beinpaar aus (im Englischen „questing pose“) (Sonenshine 1993), in denen sich das Hallersche Organ zur

Wahrnehmung von Gerüchen, Geschmacksstoffen und weiteren Reizen (u. a. Temperatur, relative Luftfeuchte, mechanische Reize) befindet (Sonenshine 1991). Zecken nehmen aber auch Schatten und Vibrationen wahr sowie vereinzelt bestimmte Laute (z. B. Kaulaute von Rindern oder Bellen von Hunden) und nutzen diese bei der Wirtssuche (Wallade und Rice 1982).

Haben sich Zecken an einen Wirt angeheftet, wird mit den Sensillen der Cheliceren und Palpen nach einer geeigneten Stelle für die Blutaufnahme gesucht. Während die Palpen überwiegend der Orientierung dienen, gehören die Cheliceren zum Stechapparat (Eckert *et al.* 2008). Die Palpen und Cheliceren, die basal zur Basis capituli verschmolzen sind, bilden mit dem Hypostom das Capitulum, welches vom Körper abgesetzt ist (Eckert *et al.* 2008, Sonenshine 1991). Das Hypostom ist ein unpaares, starres und unbewegliches Stechorgan mit nach hinten gerichteten Zähnen und liegt ventral am Capitulum unter den Cheliceren (Eckert *et al.* 2008). Zum Stechen positionieren sich die Zecken mit ihren Beinen, bringen ihren Körper in einen spitzen Winkel zum Wirtskörper und zerschneiden mit den Cheliceren die Epidermis und inserieren das Hypostom. Häufig lösen sich die Zecken kurze Zeit später wieder und wiederholen diesen Vorgang an anderer Stelle (Sonenshine 1991). Ursprünglichere Zeckenarten (z. B. *Amblyomma*) haben ein langes Hypostom, welches sie bis tief in der Dermis verankern (Eckert *et al.* 2008). Besser angepasste Zecken mit kürzerem Hypostom hingegen sekretieren zementartige Substanzen, um sich an der Saugstelle zu festigen (Eckert *et al.* 2008). Es werden lokal betäubende Stoffe sowie Gerinnungshemmer injiziert, was aufgrund des langanhaltenden Saugaktes notwendig ist. Außerdem werden Prostaglandine und Arachidonsäure abgesondert, die die Immunantwort herabsetzen sollen (Mehlhorn und Piekarski 2002). Durch Einwirkung vasoaktiver Mediatoren und Cytolysinen bildet sich subdermal eine blutgefüllte Lakune (im Englischen „pool“) (Eckert *et al.* 2008). Der Saugakt von Schildzecken gliedert sich nach Mehlhorn und Piekarski (2002) in vier Phasen: Vorbereitung des Saugkanals (maximal 24 Stunden), langsames Saugen (2 bis 4 Tage), schnelles Saugen (12 bis 36 Stunden) und schließlich schnelles Loslassen und eventuell Abfallen vom Wirt. Dabei werden beim langsamen Saugen Gewebsflüssigkeit und Zellen aus der Lakune entnommen und extra-intestinal verdaut, wodurch die Zecke langsam an Gewicht zunimmt (Eckert *et al.* 2008). Beim schnellen Saugen wird hingegen eine große Blutmenge aufgenommen. Diese wird durch Ausscheidungen von Flüssigkeit über die Speicheldrüsen konzentriert. Über das Blut können auch Krankheitserreger in die Zecke gelangen (Eckert *et al.* 2008). Der erste Kontakt der Pathogene mit der Zecke erfolgt dabei im Verdauungstrakt. Einige der aufgenommenen Mikroorganismen sind für Zecken nicht infektiös.

Andere wiederum werden verdaut bzw. vom Zeckenimmunsystem abgetötet (Kocan *et al.* 2008). So zeigt z. B. *Dermacentor variabilis*, die kein kompetenter Vektor für *Borrelia burgdorferi* ist, gegenüber diesem Erreger eine deutliche Immunantwort, während bei der Vektorzecke *Ixodes scapularis* kaum eine Immunantwort auftritt (Johns *et al.* 2001). Ein Teil der aufgenommenen Mikroorganismen ist in der Lage, die Epithelien des Verdauungstraktes zu infizieren, sich dort zu vermehren und anschließend auch andere Gewebe (einschließlich der Speicheldrüsenzellen) zu infizieren (Kocan *et al.* 2008). Durch den Zeckenspeichel wird auch eine Infektion eines neuen Wirtes möglich. Außerdem können Pathogene über Regurgitation (alter Darminhalt wird in den Wirt gepumpt) übertragen werden (Mehlhorn und Piekarski 2002). Einige Pathogene können neben der Aufnahme über das Wirtsblut auch vertikal übertragen werden; in diesem Fall wird ein Pathogen vom Weibchen auf das Ei weiter gegeben (Eckert *et al.* 2008). Ein Pathogen kann aufgrund der geringen Wirtsspezifität der meisten Zeckenarten von verschiedenen Zeckenarten übertragen werden (Mehlhorn und Piekarski 2002). Pathogene, die über Zecken übertragen werden, vermehren sich zwar in großer Zahl in der Zecke, schränken diese aber in ihrer Blutaufnahme und Entwicklung nicht ein, daher kann davon ausgegangen werden, dass eine Ko-Evolution zwischen Vektorpathogen und Vektorzecke vorliegt (Kocan *et al.* 2008, Kocan *et al.* 2005). Zur Vermeidung von Krankheitsübertragung kann u. a. die Reduzierung der Zeckendichte oder die Veränderung der Landschaften als Mittel angesehen werden (Ginsberg 1994, Ginsberg 1993).

Die Bekämpfung von Zecken

Kontrolle mit natürlichen und synthetischen Schädlingsbekämpfungsmitteln

Die Kontrolle von Zecken basiert derzeit weitestgehend auf chemischen Ektoparasitiziden (z. B. Pound *et al.* 2009, Jongejan und Uilenberg 2004, George *et al.* 2004). Es gibt verschiedene Klassen und verschiedene Wirkmechanismen von Ektoparasitiziden. Für die Versuche wurden neben Ektoparasitiziden auch Schädlingsbekämpfungsmittel, die in Deutschland (bislang) nicht zur Anwendung an Tieren zugelassen sind, gewählt. Der Einfachheit halber wird im Nachfolgenden nur noch von Schädlingsbekämpfungsmitteln gesprochen. Neben einem Wirkstoff pflanzlicher Herkunft (im Englischen „botanical“) wurden Wirkstoffe aus folgenden Klassen ausgewählt: Pyrethroide, Neonikotinoide, Phenylpyrazole, und Triazapentadiene sowie ein Wachstumsregulator. Alle ausgewählten Schädlingsbekämpfungsmittel unterscheiden sich in ihrer Wirkweise, ihrem Anwendungsgebiet und in der Resistenzentwicklung.

NeemAzal[®] gehört zu den pflanzlichen Schädlingsbekämpfungsmitteln. Die Extrakte aus den Samen des Neem-Baums (*Azadirachta indica*) enthalten die aktive Komponente Azadirachtin, welche insektizide, fungizide und bakterizide Eigenschaften aufweist (Ware und Whitacre 2004). Es verhindert bei Insekten u. a. die Häutung durch Hemmung der Biosynthese des Häutungshormons Ecdyson (Ware und Whitacre 2004). Weiterhin kann es die Fekundität der Eier und die Schlupfrate sowie die Lebensspanne von Adulten herabsetzen und kann als Fraßhemmer gegenüber allen Schädlingsstadien dienen (Ascher 1993). Zur Anwendung kommen verschiedene Formulierungen zur Kontrolle von saugenden und beißenden Pflanzenschädlingen. Neem wird aber auch gegen Parasiten wie Tierläuse und Zecken eingesetzt (Srivastava *et al.* 2008, Habluetzel *et al.* 2007). In dieser Studie wurde ein standardisiertes Produkt, NeemAzal[®] der Firma Trifolio GmbH, Lahnau, eingesetzt. Dieses besteht aus dem Extrakt der Neemsamen und hat einen Gehalt von 34,4 % der aktiven Komponente Azadirachtin A. Neem wurde ausgewählt, da es eine sehr geringe Toxizität gegenüber Säugetieren aufweist (Schmutterer 1990).

Permethrin (M-Phenoxybenzyl cis,trans 3(2,2-dichlorvinyl)-2,2-dimethylcyclopropan-carboxylat) gehört zur Gruppe der Typ I Pyrethroide, die keine Cyano-3-phenoxybenzyl-Gruppe besitzen (IRAC [Insecticide Resistance Action Committee] Gruppe 3A) (Insecticide Resistance Action Committee 2005, Ware und Whitacre 2004, Valentine 1990). Die Vorbilder synthetisch hergestellter Pyrethroide sind die natürlich vorkommenden Pyrethrine. Die Eigenschaften von Pyrethroiden und Pyrethrinen sind weitestgehend identisch (Kunkle 1997). Pyrethroide zeichnen sich aber durch eine stärkere Wirkung und höhere Lichtstabilität, verbunden mit einer höheren Residualwirkung, aus (Ware und Whitacre 2004, Blagburn und Lindsay 2001, Kunkle 1997). Die neurotoxischen Effekte zeigen sich, neben der Beeinflussung von Kalium- und Chloridkanälen, hauptsächlich in einer anhaltenden Öffnung der Natriumkanäle an der Nervenmembran. Dadurch kommt es zu andauernden Erregungszuständen, die zu Koordinationsstörungen, Lähmungen und schließlich zum Tod führen können (Ungemach 2010). Neben der abtötenden gibt es auch eine repellente Wirkung (Kočišová und Para 1999, Lane und Anderson 1984). Permethrin-Präparate haben ein breites Anwendungsgebiet; eine ausreichende akarizide Wirkung kann in Abhängigkeit von der Formulierungsart erreicht werden (Ungemach 2010). Die Säugetiertoxizität ist relativ gering (Hornbostel *et al.* 2005), da der Wirkstoff von Säugetieren bei der ausschließlich äußeren Anwendung (Ohrclip, Shampoo, Puder, Spot-on) kaum resorbiert und schnell hydrolytisch gespalten wird, wodurch die Rückstandsproblematik auf essbaren Produkten für den

Konsumenten vergleichsweise unbedeutend ist (Richter und Steuber 2010, Ungemach 2010). Bei Anwendung im Haarkleid von Nutztieren verlängert sich insbesondere die Persistenz aufgrund der verminderten Lichtexposition und der starken Bindung des Wirkstoffes an lipophile Oberflächen und dem dort vorherrschenden geringen Gasdruck (Nolan *et al.* 1979). Es haben sich gegen Pyrethroide aber bereits weltweit Resistenzen entwickelt (z. B. bei *R. microplus*) (u. a. Fernandes 2001, Miller *et al.* 1999, Beugnet und Chardonnet 1995).

Das Chloronicotinylnitroguanidin-Insektizid Imidacloprid (1-[(6-chloro-3-pyridinyl)methyl]-N-nitro-2imidazolidinimin) ist in die Gruppe der neonicotinoiden Insektizide einzuordnen (IRAC Gruppe 4A) (Insecticide Resistance Action Committee 2005, Arther *et al.* 1997). Es ist ein Agonist an postsynaptischen nikotinergen Acetylcholin-Rezeptoren des Nervensystems von Insekten (Ungemach 2010, Abbink 1991). Imidacloprid verfügt über eine höhere Stabilität als Nikotin (Moffat 1993) und wirkt 50-fach stärker als dieses (Ungemach 2010). Wegen des nur geringen Abbaus durch Cholinesterasen zeigt sich nach Verabreichung eine schnelle Immobilisation („Knock-down-Effekt“) der Zielorganismen (Ungemach 2010). Des Weiteren tritt eine starke und langanhaltende Rezeptorbindung durch Neonicotinoide ein, wodurch es zur Paralyse kommt. Der Tod der Insekten tritt durch Hemmung der Erregungsübertragung ein (Richter und Steuber 2010). Hauptsächlich wird Imidacloprid gegen Pflanzenschädlinge, aufgrund der guten systemischen Eigenschaften vor allem gegen saugende, angewendet (Horowitz und Ishaaya 2004). Außerdem wird es bei Hund und Katze zur Flohbekämpfung eingesetzt (Blagburn und Lindsay 2001). Eine Anwendung bei Säugern ist gut verträglich (Richter und Steuber 2010, Kunkle 1997, Yamamoto *et al.* 1995). Auch für Vögel, Fische und wirbellose Wasserorganismen sind Neonicotinoide nicht toxisch (Ungemach 2010). Auf Milben hat es keine Wirkung (Ware und Whitacre 2004) und gegen Zecken wird es nur in der Kombination mit anderen Wirkstoffen eingesetzt. Im Haustierbereich wird z. B. die repellente und abtötende Wirkung der Kombination aus Permethrin und Imidacloprid zur Bekämpfung von Flöhen, Zecken und Stechmücken genutzt (Ungemach 2010). Dennoch wurde es für diese Studie ausgewählt, da verschiedene Studien mit entomopathogenen Pilzen eine verbesserte Wirkung der Pilze in Verbindung mit geringen Konzentrationen von Imidacloprid zeigten (Jaramillo *et al.* 2005, Quintela und McCoy 1998a).

Fipronil (5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoro-methyl)phenyl]-4-[(trifluoromethyl)sulfinyl]-1H-pyrazol-3-carbonitril), das zur Gruppe der Phenylpyrazole gehört (IRAC Gruppe 2B), ist

ein Kontaktgift ohne repellente Wirkung und blockiert GABA-gesteuerte Chloridkanäle nicht kompetitiv (Ungemach 2010, Insecticide Resistance Action Committee 2005, Blagburn und Lindsay 2001, Cole *et al.* 1993). Dadurch kommt es zu einer Übererregung und schließlich dem Tod des Parasiten (Ungemach 2010). Fipronil zeichnet sich durch eine schnelle Kontakt- und eine langanhaltende Residualwirkung aus, wodurch zwischen den einzelnen Anwendungen große Zeiträume liegen können (Richter und Steuber 2010, Blagburn und Lindsay 2001, Wiedemann 2000, Postal *et al.* 1995). Es ist schlecht wasserlöslich; Wasser und Sonnenlicht beeinflussen die Wirkung von Fipronil aber nicht (Kunkle 1997). Es hat ein breites Nutzungsspektrum und ist zur Kontrolle verschiedener Ektoparasiten, einschließlich Zecken, zugelassen. Es ist effektiv gegen Schädlinge, die bereits gegen Pyrethroide, Organophosphate und Karbamate resistent sind (Ware und Whitacre 2004, Davey *et al.* 1998). Für Vertebraten ist es weitestgehend ungefährlich, da die Rezeptoren von Vertebraten eine deutlich geringere Affinität gegenüber Fipronil aufweisen als die von Arthropoden (Ungemach 2010, Kunkle 1997). Für Vögel, Reptilien (bei oraler Aufnahme) und Fische kann es jedoch hoch toxisch sein (Peveling und Demba 2003, United States Environmental Protection Agency 1996). Eines der Hauptabbauprodukte (Fipronildesulfinyl) ist generell toxischer (auch für Säugetiere) als Fipronil und weist zudem eine höhere Persistenz als Fipronil auf (Hainzl *et al.* 1998, Hainzl und Casida 1996).

Amitraz (N'-(2,4-dimethylphenyl)-N[[2,4-dimethylphenyl]imino]methyl]-N-methylmethanimidamide) ist ein Formamidinderivat aus der Gruppe der Triazapentadiene (Ungemach 2010, Ware und Whitacre 2004, Kunkle 1997). Es zeigt eine hohe Wirksamkeit gegen Milben, Zecken und Läuse und eignet sich damit für die Kontrolle von Parasiten auf Tieren; außerdem hat es eine repellente Wirkung (Richter und Steuber 2010, Ungemach 2010, Blagburn und Lindsay 2001). Als Wirkmechanismus wird entweder eine Wirkung auf die Octopaminrezeptoren im zentralen Nervensystem (IRAC Gruppe 19) (Richter und Steuber 2010, Insecticide Resistance Action Committee 2005) oder eine Hemmung des Monoaminoxidaseenzym vermutet (Blagburn und Lindsay 2001). Dieses führt zu Übererregbarkeit und in der Folge zu abnormem Verhalten, Paralyse und Tod (Ungemach 2010). Bei Zecken tritt eine Paralyse der Mundwerkzeuge ein, was ein Festsetzen an Wirten verhindert bzw. ein Ablösen von bereits festgesetzten Zecken zur Folge hat (Gupta 2007). Amitraz wird in der Umwelt schnell abgebaut (Jonsson und Hope 2007, Ungemach 2010). Es ist zwar nicht toxisch für Bienen und Vögel, sollte aber aufgrund der hohen Fischtoxizität nicht in Gewässer gelangen (Ungemach 2010). Die Toxizität für Menschen und Rinder ist

relativ gering (Jonsson und Hope 2007). Amitraz ist in Deutschland zurzeit nur zur Behandlung von Hunden zugelassen (Ungemach 2010). In Österreich ist die Anwendung an Schweinen (Tactic[®] – 12,5 % Amitraz) zugelassen. Die Wartezeit beträgt dabei sieben Tage (Bundesministerium für Gesundheit 2011). In der Schweiz ist Amitraz außer für die Anwendung am Schwein (1 Tag Wartezeit) zusätzlich für die Behandlung am Rind (4 Tage Wartezeit) sowie am Schaf und an der Ziege (24 Tage Wartezeit) zugelassen (Richter und Steuber 2010). Die Stabilität von Amitraz wird sowohl durch UV-Licht, Temperatur, aber auch durch den pH-Wert und die Lösungsmittelart beeinflusst (Corta *et al.* 1999, Bernal *et al.* 1997, Pierpoint *et al.* 1997). Bei längerer Lagerung einer fertigen Lösung kann es zum Zerfall in die Zwischenprodukte 2,4-Dimethylphenylformamid, N-2,4-dimethylphenyl-N-methylformamidin oder in das stabilere, genotoxische 2,4-Dimethylanilin kommen (Brimecombe und Limson 2006, Osano *et al.* 2002). Begünstigt wird die Hydrolyse von Amitraz durch einen niedrigen pH-Wert (Brimecombe und Limson 2006, Corta *et al.* 1999). Ältere Sprühlösungen können folglich Intoxikationen, z. B. bei Pferden, verursachen (Auer *et al.* 1984). Dafür scheint die Resistenzentwicklung im Vergleich zu Permethrin langsamer voranzuschreiten (Jonsson und Hope 2007). In Australien wurde der erste resistente *R. microplus*-Stamm fünf Jahre nach Einführung von Amitraz identifiziert (Nolan 1981), während Fälle von Amitraz-Resistenzen in Mexiko erst sieben Jahre nach der Einführung identifiziert wurden (Soberanes *et al.* 2002).

Obwohl es in Deutschland nur an Hunden zugelassen ist (Ungemach 2010), wurde es in die vorliegende Studie an *R. microplus* mit einbezogen, um im Rahmen der Studie (Trilaterales Projekt Deutschland-Israel-Palästina) auch einen in Israel relevanten Wirkstoff zu testen, da Amitraz in Israel im Gegensatz zu Fipronil als Ektoparasitizid bei Rindern angewendet werden darf (Samish, persönliche Mitteilung).

Etoxazol (2-(2,6-difluorophenyl)-4[4-(1,1-dimethylethyl)-2-ethoxyphenyl]-4,5-dihydro-oxazol) gehört in die Substanzgruppe der Milbenwachstumshemmer, die eine unbekannte oder unspezifische Wirkweise haben (IRAC Gruppe 10B) (Insecticide Resistance Action Committee 2005, Ware und Whitacre 2004). Es ist ein Derivat des 2,4-Diphenyl-1,3-Oxazolines und verschiedene Autoren gehen davon aus, dass es, ähnlich wie Benzoylphenylharnstoff-Insektizide, die Chitinsynthese inhibiert (Nauen und Smagghe 2006, Suzuki *et al.* 2001). Da Chitinsynthese-Inhibitoren nicht neurotoxisch wirken und in einen bei Vertebraten nicht vorkommenden Biosyntheseweg eingreifen, werden sie bei oraler Aufnahme generell als relativ sicher für Säugetiere angesehen (Sheets 2007, Dekeyser 2005).

Außerdem wird es in der Umwelt schnell abgebaut (Dekeyser 2005). Zuerst wurde es 2002 zur Behandlung von Zierpflanzen im Gewächshaus eingesetzt (Ware und Whitacre 2004). Erste Versuche zur Wirksamkeit gegen Zecken (*Haemaphysalis longicornis*) deuteten das mögliche Potenzial als Zeckenbekämpfungsmittel an (Tamura *et al.* 2004). Für diese Studie wurde es ausgewählt, um es kombiniert mit den beiden Pilzstämmen gegen gesogene Nymphen (*Amblyomma hebraeum* Koch, 1844 [Acari: Ixodidae]) anzuwenden und deren Häutung zur adulten Zecke zu verhindern, sofern zuvor kein Effekt auf die Chitinsynthese des Pilzes festgestellt wurde.

Die vorgestellten Schädlingsbekämpfungsmittel sind effektiv, es gibt aber toxikologische und Umweltverträglichkeitsbedenken (Willadsen 2006, Gassner *et al.* 1997, Ginsberg 1994). Besonders bei der Behandlung von Nutztieren kommen Warteperioden hinzu und die Behandlung von Habitaten, in die Zecken sich zur Häutung und Eiablage zurückziehen, kann Nebeneffekte auf Nicht-Zielorganismen zur Folge haben (Schulze *et al.* 2005, Schulze *et al.* 2001, Wall und Strong 1987). Des Weiteren führen wachsende Probleme mit Akarizidresistenzen (Castro-Janer *et al.* 2010, Alonso-Díaz *et al.* 2006, Foil *et al.* 2004, Nolan 1990) zur Notwendigkeit einer Suche nach alternativen Möglichkeiten der Zeckenkontrolle.

Biologische Kontrolle mit entomopathogenen Pilzen

Die biologische Kontrolle ist eine mögliche Alternative zur chemischen Kontrolle. Insbesondere entomopathogene Pilze sind eine vielversprechende Gruppe in der biologischen Zeckenbekämpfung. Es sind über 700 Arten von entomopathogenen Pilzen aus unterschiedlichen Klassen bekannt (Wraight *et al.* 2007). Es wird ein weiter Wirtsbereich unter den Arthropoden abgedeckt (Alves 1998, Goettel und Inglis 1997). Außerdem sind entomopathogene Pilze in den meisten ökologischen Nischen (im Wasser, unter der Erde und an der Luft) zu finden (Hajek und St. Leger 1994). Laut Shah und Pell (2003) werden Studien mit entomopathogenen Pilzen hauptsächlich mit Pilzen aus der Klasse der Entomophthorales (Zygomycota) und der Hyphomycetes (Deuteromycota) durchgeführt. Pilze, die zum Stamm der Deuteromyces zählen, zeichnet aus, dass sie sich hauptsächlich asexuell (anamorphisch) reproduzieren. Als Reproduktionsmittel dient die nicht-bewegliche Konidie, die bei den Hyphomyceten an freien oder an kumulierten Hyphen gebildet wird (Boucias und Pendland 1998). Einige Stämme aus dieser Klasse sind bereits als kommerzielle Produkte erhältlich (u. a. *Verticillium lecanii* gegen Blattläuse, *Beauveria bassiana* gegen verschiedene Schädlinge, *Metarhizium anisopliae* [Metschnikoff, 1879] Sorokin, 1883 [nach neuer

Einteilung: Hypocreales: Clavicipitaceae; nach alter Einteilung: Deuteromycota: Hyphomycetes] gegen Heuschrecken) (Shah und Pell 2003).

Metarhizium, aufgrund der grünlichen Färbung seiner Konidien im Englischen auch als „green muscardine fungus“ bezeichnet, ist von der Arktik bis zu den Tropen in jedem Habitattyp zu finden, ist aber eigentlich ein Bodenpilz (Bidochka und Small 2005, Boucias und Pendland 1998). Diese Gattung umfasst nach derzeitiger Einteilung elf Arten, darunter auch *M. anisopliae* (Bischoff *et al.* 2009). *M. anisopliae* hat einen breiten Wirtsbereich, dieser kann je nach Stamm jedoch auch sehr eingeschränkt sein (Wraight *et al.* 2007). Die meisten Stämme haben aber nur eine geringe Wirtsspezifität (Bidochka und Small 2005). Diese ist für die Auswahl eines Stammes allerdings wichtig, um Effekte auf Nicht-Zielorganismen zu vermeiden.

Die Infektion verläuft bei den meisten entomopathogenen Pilzen ähnlich, wobei die Keimung als wichtiger Schritt der Infektion angesehen wird. Dazu ist der Kontakt zwischen Konidie und Wirt Voraussetzung (Samson *et al.* 1988). Die Konidienausbreitung erfolgt bei den meisten entomopathogenen Pilzen passiv über Wind oder Wasser (Wraight *et al.* 2007), so dass der Wirtskontakt zufällig geschieht und von Witterungsbedingungen, der Konidienanzahl und der Wirtsdichte abhängt (Samson *et al.* 1988). Nach Anheftung an der Wirtskutikula über hydrophobe Wechselwirkungen erfolgt die Keimung (Boucias und Pendland 1998). Die Nährstoffe für die Keimung werden aus dem enzymatischen Kutikulaabbau, der sich nur auf die nähere Umgebung der angehefteten Spore beschränkt, gewonnen (Vilcinskis und Götz 1999). Einige Kutikulabestandteile, z. B. Fettsäuren, haben eine inhibierende Wirkung auf die Keimung der Konidie (Smith und Grula 1982). Außerdem können exogene antimikrobielle Flüssigkeiten, die die Kutikulaoberfläche bedecken, den Keimungsprozess zum Erliegen bringen. In der Regel reichen günstige Nährstoff- und Luftfeuchtigkeitsbedingungen aus, um eine Keimung zu induzieren (Vilcinskis und Götz 1999). Die Konidie formt ein Appressorium, welches über einen amorphen schleimigen Film mit der Kutikula verbunden wird. Dieser Film füllt auch Lücken zwischen Konidie, Appressorium und Kutikula auf (Boucias und Pendland 1998). Die Wachsschicht der Kutikula wird dabei teils für die Bindung zwischen Konidie und Kutikula genutzt und teils zur Nährstoffgewinnung degradiert (Boucias und Pendland 1998). Der Keimschlauch der gekeimten Konidie dringt in den Wirt ein (Samson *et al.* 1988). Dabei wird der mechanische Prozess des Eindringens durch vom entomopathogenen Pilz produzierte Enzyme unterstützt (Zimmermann 2007). Bereits das Durchdringen der Kutikula wird von Immunreaktionen des Wirtes begleitet. Es kann zunächst an der Epikutikula um die Pilz-Eintrittsstelle herum zu Melanisierungsreaktionen kommen,

die durch Phenoloxidasereaktionen hervorgerufen werden (Gillespie und Kanost 1997). Diese Reaktion hat zwar fungizides Potenzial, reicht aber selten aus, um die Infektion zu verhindern (St. Leger *et al.* 1988). Danach muss der entomopathogene Pilz die ektodermale Epidermis, die aus Zellen mit einem hohen Gehalt an antimikrobiellen Proteinen (z. B. Lysozyme) besteht, passieren. Im Wirtsinnen angekommen, ist der entomopathogene Pilz weiteren Immunreaktionen ausgesetzt (Vilcinskas und Götz 1999). Die meisten entomopathogenen Pilze verteilen sich innerhalb des Wirtes als Protoplasten oder Hyphenkörper (im Englischen „hyphal bodies“). Diese Zellen haben keine vollständig ausgebildete Zellwand, wodurch sie die Erkennung durch Zellen des Immunsystems vermeiden können. Trotzdem kann es während der beginnenden Mykose zur Phagozytose kommen. Die Fähigkeit der Haemozyten Pilzkörper zu erkennen und zu phagozytieren, nimmt mit zunehmender Mykose aber immer weiter ab. Auch die Anzahl der Haemocyten nimmt mit Zunahme von frei zirkulierenden Hyphen ab. Ergebnisse der Studie von Vilcinskas und Mat’ha (1997) legen den Schluss nahe, dass die entomopathogenen Pilze die Immunantwort des Wirtes aktiv vermeiden oder unterdrücken können. Der Wirt stirbt an einer Mischung aus Nährstoffmangel, Organversagen und Toxinen (Wraight *et al.* 2007). Bei günstigen Umweltbedingungen kommt es zum Auswachsen des entomopathogenen Pilzes aus dem Körper und es werden neue Konidien produziert (Alves 1998). Von der Infektion bis zum Tode dauert es je nach Zustand des Wirtes und den Umweltbedingungen zwei bis acht Tage, es kann aber auch bis zu vier Wochen dauern (Alves 1998, Zimmermann 2007). Entomopathogene Pilze haben einige Vorteile gegenüber anderen Schädlingsbekämpfungsmitteln. Ihre Herstellung in großen Mengen ist relativ einfach und eine Konidiensuspension kann wie ein herkömmliches Pestizid ausgebracht werden (Wraight *et al.* 2007, Roberts und St. Leger 2004). Konidien können direkt in den Zielorganismus eindringen, sobald sie an der Kutikula haften und müssen auch nicht, wie viele andere Insektenpathogene, oral aufgenommen werden (Samish und Rehacek 1999). Nicht zuletzt ist das sekundäre Verbreitungspotenzial der entomopathogenen Pilze, wodurch auch versteckte Schädlinge erreicht werden können, von Bedeutung (Langewald *et al.* 1999, Kaaya und Okech 1990). Des Weiteren werden entomopathogene Pilze als relativ sicher für die Umwelt angesehen (u. a. Zimmermann 2007, Roberts und St. Leger 2004) und hinterlassen im Gegensatz zu vielen chemischen Pestiziden auch keine toxikologisch relevanten Stoffe an behandelten Tieren (Zimmermann 1992). Allerdings reagieren z. B. Embryonen der Neuweltlichen Ährenfischart *Menidia beryllina*, des Krallenfrosches *Xenopus laevis* und der Schwimmgarnele *Palaemonetes pugio* empfindlich auf Konidien von entomopathogenen Pilzen (Genthner *et al.* 1998, Genthner und Middaugh 1995). Die

Säugetier-Sicherheit ist gewährleistet, solange es sich um Stämme handelt, die bei Säugetierkörpertemperatur nicht keimfähig sind (Boucias und Pendland 1998). In Einzelfällen können sich immunsupprimierte Individuen allerdings Infektionen zuziehen (Roberts und St. Leger 2004). Außerdem wurde häufiger über leichte allergische Reaktionen gegenüber den Konidienstäuben entomopathogener Pilze berichtet (Roberts und St. Leger 2004, Schaerfenberg 1968). Effekte auf Nicht-Zielorganismen können bei Auswahl geeigneter Stämme auf niedrigem Niveau gehalten werden (Bidochka und Small 2005). Die Wirtsempfindlichkeit ist unterschiedlich und wird durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst (Goettel und Inglis 1997). Gegenüber verschiedenen Zeckenarten kann sie hoch sein, aber sie schwankt zum Teil erheblich (u. a. Kirkland *et al.* 2004a, Kirkland *et al.* 2004b, Leemon und Jonsson 2008, Gindin *et al.* 2002). Ungünstige und schwankende Umweltbedingungen, gegen die der Pilz empfindlich ist, sind z. B. eine geringe Luftfeuchte, hohe Temperaturen und starke UV-Strahlung (Boucias und Pendland 1998, Zimmermann 1982). Durch diese Faktoren kann die Fähigkeit des Pilzes zu überleben, sich zu verbreiten, einen Zielorganismus zu infizieren und abzutöten zum Teil erheblich beeinflusst werden (Wraight *et al.* 2007). Ein Nachteil ist auch der relativ langsame Wirkungseintritt. In der Regel dauert es von der Infektion bis zum Tod des Wirtes zwei bis acht Tage (Alves 1998), während herkömmliche Ektoparasitizide laut Holdsworth *et al.* (2006) bei Anwendung gegen euryxene Zecken eine Effizienz von 95 % nach vier Tagen erreichen sollen. Daher ist es erforderlich, die Virulenz der entomopathogenen Pilze zu stabilisieren und auch die Wirkungsgeschwindigkeit zu verbessern, um eine verlässliche Zeckenbekämpfung zu gewährleisten. Eine Verbesserung könnte über Zusatzstoffe (u. a. niedrig dosierte Schädlingsbekämpfungsmittel, Kieselgel) erreicht werden, sofern diese den Pilz nicht negativ beeinflussen.

Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war, durch Kombination von niedrig dosierten Schädlingsbekämpfungsmitteln mit *M. anisopliae* die Bedingungen für eine Pilzinfektion zu verbessern und die Abtötung der Zielorganismen durch *M. anisopliae* zu beschleunigen. Durch diese Kombination könnte der Einsatz von herkömmlichen Schädlingsbekämpfungsmitteln reduziert werden und das Risiko einer Umweltverschmutzung sowie Effekte auf Nicht-Zielorganismen minimiert werden. Eine Effizienzsteigerung von *M. anisopliae* kann aber nur erzielt werden, sofern die eingesetzten Schädlingsbekämpfungsmittel *M. anisopliae* nicht negativ beeinflussen. Mögliche negative Effekte könnten sich in der Hemmung physiologischer Prozesse (Keimung, vegetatives Wachstum,

Konidiogenese) zeigen (Alves *et al.* 1998). Vor einem kombinierten Einsatz von Schädlingsbekämpfungsmitteln und *M. anisopliae* war also in einem ersten Schritt die Untersuchung der Kompatibilität der einzusetzenden Komponenten notwendig (Kapitel 1). In einem zweiten Schritt wurden von ausgewählten Schädlingsbekämpfungsmitteln subletale Konzentrationen sowie die Abhängigkeit der Wirkungsgrade der beiden Stämme von *M. anisopliae* von der Konzentration applizierter Sporensuspensionen ermittelt. Diese ermittelten Konzentrationen wurden dann in einem dritten Schritt als Kombinationen getestet. Bei der dreiwirtigen Zecke *A. hebraeum* (im Englischen „bont tick“), die im südlichen Afrika vorkommt, konzentrierten sich die Untersuchungen auf das vollgesogene Nymphenstadium und die mögliche Verhinderung der Entwicklung zur Adulten (Kapitel 2). Zum Vergleich der Empfindlichkeit wurden einige Tests mit ungesogenen Adulten durchgeführt. Von dem Kosmopoliten *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) (Braune Hundezecke) wurden, aufgrund der limitierten Anzahl von Versuchstieren einzig die ungesogenen Adulten untersucht (Kapitel 3). Von der zur Subgattung *Boophilus* gehörenden und nur in den Tropen und Subtropen verbreiteten (Khan 2010, Nicholson *et al.* 2009) Zeckenart *R. microplus* (südliche Rinderzecke) wurden alle Stadien, die nicht auf dem Wirt leben (Eier, ungesogene Larven, vollgesogene Weibchen) getestet und die Effekte des Pilzes auf die Mortalität, die Menge der abgelegten Eier und die Schlupfrate bestimmt (Kapitel 4).

Kapitel 1: *In vitro* Wirkung von Schädlingsbekämpfungsmitteln auf Keimung, vegetatives Wachstum und Konidienproduktion zweier Stämme von *Metarhizium anisopliae*

Zusammenfassung – Entomopathogene Pilze werden in der biologischen Schädlingsbekämpfung gegen viele verschiedenartige Insekten und Spinnentiere eingesetzt. Die Wirksamkeit der entomopathogenen Pilze variiert aber abhängig von nicht vorteilhaften und sich ändernden Umweltbedingungen sowie weiteren Faktoren stark. Eine Möglichkeit ihre Wirksamkeit zu erhöhen ist der Einsatz einer Kombination aus entomopathogenem Pilz und niedrig dosiertem Schädlingsbekämpfungsmittel. In subletalen Konzentrationen können verschiedene Wirkstoffe die Wirksamkeit des entomopathogenen Pilzes erhöhen, wenn sie Entwicklung, Virulenz und sekundäres Verbreitungspotenzial des Pilzes nicht negativ beeinflussen. Nachteilige Auswirkungen kann es insbesondere durch die Hemmung der Keimung, des vegetativen Wachstums, der Sporenbildung und der Sporulation geben.

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene Konzentrationen von Fipronil, Permethrin, Imidacloprid, NeemAzal[®], Amitraz und Etoxazol, die als potenzielle Kandidaten für kombinierte Applikationen ausgewählt wurden, mit zwei Stämmen des entomopathogenen Pilzes *Metarhizium anisopliae in vitro* getestet. *M. anisopliae* wurde auf Medium, das mit fünf verschiedenen Konzentrationen der oben genannten Schädlingsbekämpfungsmittel angereichert wurde, inokuliert. Keimung, Myzelwachstum und Sporulation wurden evaluiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die getesteten Schädlingsbekämpfungsmittel gemäß der Klassifizierung von Alves *et al.* (1998), die Myzelwachstum und Sporulation berücksichtigt, mit beiden getesteten Stämmen von *M. anisopliae* kompatibel sind. Nur die höheren Dosen von Fipronil (40 und 200 ppm) und Etoxazol (20 und 100 ppm) mussten gegenüber einem der getesteten *M. anisopliae*-Stämme (MA-7) als moderat toxisch bzw. toxisch (100 ppm Etoxazol) eingestuft werden. Des Weiteren hemmten nur die hohen Konzentrationen der Wirkstoffe die Keimung und das Koloniewachstum leicht. Die Sporulation wurde stärker (maximal um 63 %) durch die höhere Konzentration von Etoxazol, Fipronil und Amitraz reduziert.

Es ist also möglich, beide Stämme von *M. anisopliae* mit den meisten getesteten Konzentrationen der Wirkstoffe zu kombinieren.

Key-words: *Metarhizium anisopliae*, Schädlingsbekämpfungsmittel, Kompatibilität, Keimung, vegetatives Wachstum

1.1 Einleitung

Die biologische Schädlingskontrolle rückt wegen des Auftretens von Resistenzen (z. B. Castro-Janer *et al.* 2010, Alonso-Díaz *et al.* 2006), ökotoxikologischer Bedenken (z. B. Schulze *et al.* 2005, Gassner *et al.* 1997) und ökonomischer Gesichtspunkte (z. B. Ocaido *et al.* 2009, Pegram *et al.* 1991) als Alternative zur Bekämpfung mit chemischen Schädlingsbekämpfungsmitteln in den Vordergrund. Für die biologische Bekämpfung von Zecken sind vor allem entomopathogene Pilze vielversprechend, da sie Vorteile gegenüber Schädlingsbekämpfungsmitteln oder anderen biologischen Agenzien besitzen. Dazu zählen die einfache Herstellung, die schädlingsbekämpfungsmittelähnliche Ausbringungsweise (Wraight *et al.* 2007, Roberts und St. Leger 2004), das direkte Eindringen in den Wirt (Samish und Rehacek 1999, Boucias und Pendland 1998), ihr sekundäres Verbreitungspotenzial (Langewald *et al.* 1999, Kaaya und Okech 1990) und ihre relative Sicherheit gegenüber Nicht-Zielorganismen (u. a. Zimmermann 2007, Roberts und St. Leger 2004). Als klarer Nachteil ist allerdings die starke Variabilität der Empfindlichkeit verschiedener Zeckenspezies gegenüber entomopathogenen Pilzen anzusehen (u. a. Kirkland *et al.* 2004a, Kirkland *et al.* 2004b, Gindin *et al.* 2002). Diese Unterschiede der Wirksamkeit mögen zum einen durch ungünstige Umweltbedingungen, z. B. geringe Luftfeuchte, hohe Temperaturen und hohe UV-Strahlung, zu Stande kommen (Wraight *et al.* 2007, Zimmermann 1982). Zum anderen können sie aber auch eine Folge intrinsischer Faktoren, wie die unterschiedliche Lipidzusammensetzung der Kutikula (Ment *et al.* 2010) oder eine variable Immunabwehr der Wirtsarten, sein. Die Virulenz des entomopathogenen Pilzinokulums kann dadurch negativ beeinflusst und der Prozess der Abtötung des Zielorganismus verlangsamt werden.

Eine Möglichkeit, diese Variabilität der Wirksamkeit entomopathogener Pilze zu verringern, ist der kombinierte Einsatz von entomopathogenen Pilzen mit niedrigen Konzentrationen natürlicher oder synthetischer Schädlingsbekämpfungsmittel. Diese können das Verhalten der Zielorganismen so verändern, dass die Chance einer Infektion erhöht wird. So konnte z. B. Imidacloprid die durch entomopathogene Pilze verursachten Infektionen erhöhen, da es den mit Imidacloprid behandelten Larven von *Diaprepes abbreviatus* aufgrund von Immobilität nicht möglich war die Konidien von der Kutikula abzustreifen (Quintela und McCoy 1998a). Imidacloprid kann aber auch das Putzverhalten beeinflussen, wodurch eine Infektion begünstigt wird (Moino Jr. und Alves 1998). Des Weiteren wäre auch das Herabsetzen der Abwehr durch Schädlingsbekämpfungsmittel eine mögliche Wirkweise (Hiromori und Nishigaki 2001, Hassan und Charnley 1989). Dabei sollte die Nutzung niedrig dosierter

Schädlingsbekämpfungsmittel das Risiko von Rückständen auf dem Wirt oder in der Umwelt verringern sowie unerwünschte Effekte auf Nicht-Zielorganismen minimieren. Eine Effizienzsteigerung des Pilzes kann aber nur erzielt werden, sofern die eingesetzten Schädlingsbekämpfungsmittel die Lebensfähigkeit, die Entwicklung und die Virulenz des entomopathogenen Pilzes nicht negativ beeinflussen. Mögliche negative Effekte wären die Hemmung der Keimung, des vegetativem Wachstums und der Konidiogenese der Pilze (Alves *et al.* 1998). Vor einem kombinierten Einsatz von Schädlingsbekämpfungsmitteln und entomopathogenen Pilzen ist also eine Untersuchung der Kompatibilität der einzusetzenden Komponenten unabdingbar. Deshalb wurden die Effekte von einem Lösungsvermittler und sieben Schädlingsbekämpfungsmitteln und einer Schädlingsbekämpfungsmittel-Kombination auf zwei Stämme des entomopathogenen Pilzes *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 (Hypocreales: Clavicipitaceae) (MA-7 und MA-K) getestet. Dabei wurde die Kompatibilität der Stämme mit Dimethylsulfoxid (DMSO), welches als Lösungsmittel für die hydrophoben Reinstoffe genutzt wurde, vorab untersucht. Anschließend wurden die, mit Blick auf die späteren Kombinationsversuche, ausgewählten Schädlingsbekämpfungsmittel, hinsichtlich ihrer Wirkung auf die beiden *M. anisopliae*-Stämme untersucht. Die verwendeten Schädlingsbekämpfungsmittel gehören zu unterschiedlichen Substanzklassen und haben alle einen anderen Wirkmechanismus (siehe auch *Allgemeine Einleitung – Kontrolle mit natürlichen und synthetischen Schädlingsbekämpfungsmitteln*).

Durch die Ermittlung der Kompatibilitäten der Schädlingsbekämpfungsmittel mit den beiden Pilzstämmen (siehe *1.3 Ergebnisse*) kann die Auswahl für die kombinierten Applikationen weiter eingengt werden.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Schädlingsbekämpfungsmittel

Die getesteten Präparate NeemAzal[®] (Trifolio-M GmbH, Lahnau), Permethrin, Imidacloprid, Amitraz, Fipronil (alle Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), und Etoxazol (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg) lagen als Reinstoffe in Pulverform vor. Aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) als Lösungsmittel verwendet. Da nicht bekannt war, in welchen Konzentrationen DMSO mit den beiden *M. anisopliae*-Stämmen kompatibel ist, wurden in einem ersten Schritt die konzentrationsabhängigen Effekte von DMSO (1, 2, 4, 6 und 10 %) untersucht, um eine Konzentration zu ermitteln, die einerseits als Lösungsvermittler effektiv ist, andererseits aber gegenüber beiden *M. anisopliae*-Stämmen keine toxischen Effekte hat.

Die Schädlingsbekämpfungsmittel (bis auf Etoxazol und die Kombination aus Permethrin und Imidacloprid) wurden in folgenden fünf Konzentrationen getestet: 0,32; 1,6; 8; 40; 200 ppm. Diese Konzentrationsbreite wurde gewählt, um aus der Dosis-Wirkungs-Beziehung die Konzentrationen identifizieren zu können, die keinen Effekt auf Zecken haben (subletale Dosis). Von Etoxazol wurden zehnfach geringere Konzentrationen (0,032; 0,16; 0,8, 4; 20 und 100 ppm) eingesetzt, da Etoxazol auf Zecken bereits in deutlich geringeren Konzentrationen wirkt. Für die Kombination von Permethrin und Imidacloprid, wurde das Verhältnis (5:1) des Handelspräparates Advantix® zu Grunde gelegt und folgende vier Konzentrationen untersucht: 1,6 ppm Permethrin und 0,32 ppm Imidacloprid sowie 8 und 1,6; 40 und 8; 200 und 40 ppm. Medium – bestehend aus Kartoffel-Dextrose-Agar (39,5 g/l), Hefeextrakt (5 g/l) und Pepton (5 g/l) – welches nicht mit DMSO versetzt war, diente als Kontrolle. In Fällen, in denen sich das Schädlingsbekämpfungsmittel als nicht kompatibel mit dem Pilz erwies, wurden die Werte noch einmal mit den Werten der dazugehörigen DMSO-Konzentration verglichen, um zu überprüfen, ob der ermittelte Effekt ausschließlich dem Schädlingsbekämpfungsmittel zuzuschreiben war.

Die Schädlingsbekämpfungsmittel wurden in DMSO gelöst und dem Medium, nachdem es autoklaviert (121 °C, 20 Minuten) und genügend abgekühlt war, hinzugefügt. Ein anschließendes zweiminütiges Schütteln diente der gleichmäßigen Verteilung des Schädlingsbekämpfungsmittels im Medium. Petrischalen (90 mm Durchmesser) wurden mit circa 25 ml Medium gefüllt. Jeder Konzentrationsversuch wurde viermal wiederholt. Bei jeder Wiederholung wurden fünf Petrischalen pro Pilzstamm und Konzentration eines Schädlingsbekämpfungsmittels zur Bestimmung der Keimung (eine Petrischale) und des vegetativen Wachstums und der Konidienproduktion (vier Petrischalen) benutzt.

1.2.2 Entomopathogene Pilze

Es wurden zwei verschiedene Stämme von *M. anisopliae* untersucht: i) Stamm K, der in Kenia von *Amblyomma variegatum* isoliert wurde, und ii) Stamm 7, der in Israel von einem nicht bestimmten Käfer isoliert wurde. Beide Stämme stammen aus der von Dr. Galina Gindin betreuten Sammlung entomopathogener Pilze der entomologischen Arbeitsgruppe des Volcani Centers (Bet Dagan, Israel). MA-K und MA-7 wurden zwei Wochen lang auf Kartoffel-Dextrose-Agar (39,5 g/l), der mit Hefeextrakt (5 g/l) und Pepton (5 g/l) angereichert wurde, in einer Klimakammer bei 25 ± 1 °C und einer Licht-Dunkel-Periode von 16 Stunden zu 8 Stunden angezogen. Die Konidien wurden abgeerntet und in sterilem *Aq. dest.*, das mit 0,05 % Tween®80 (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) versetzt war, suspendiert. Eine

Konidienkonzentration von $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml wurde für die Bestimmung von Keimung, Wachstum und Konidienproduktion mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer (mit einer Tiefe von 0,2 mm und einer Fläche von $0,0625 \text{ mm}^2$) eingestellt.

1.2.3 Keimung

Zur Bestimmung der Keimrate wurden $100 \mu\text{l}$ der Konidien suspension ($1,0 \times 10^7$ Konidien/ml) auf die mit Medium gefüllten Petrischalen (siehe 1.2.1 *Schädlingsbekämpfungsmittel*) gegeben, mit einem Drigalski-Spatel gleichmäßig verteilt und bei $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ im Dunkeln für 20 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Petrischalen in einen Kühlschrank gestellt (circa zwei Stunden), um die Keimung zu stoppen. Um die Keimrate zu bestimmen, wurden die Konidien mit einer Lösung, die Glycerol, Milchsäure und Methylblau enthielt, gefärbt und je drei Stücke von 1 cm^2 Größe aus dem Agar einer Petrischale ausgeschnitten. Diese Stücke wurden unter einem Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Gekeimte und nicht-gekeimte Sporen wurden gezählt (100 Konidien/Stück), wobei Konidien, deren Keimschläuche mindestens so lang waren wie die angeschwollene Konidie, als gekeimt gezählt wurden.

1.2.4 Vegetatives Wachstum und Konidienproduktion

Zur Erfassung des vegetativen Wachstums der Kolonien und der gebildeten Menge an Konidien wurde ein Tropfen (circa $2 \mu\text{l}$) der Konidien suspension ($1,0 \times 10^7$ Konidien/ml) in der Mitte einer Petrischale (90 mm Durchmesser), die mit den bereits beschriebenen Medien (siehe 1.2.1 *Schädlingsbekämpfungsmittel*) gefüllt war, inokuliert. Vier Petrischalen wurden pro Pilzstamm für jede Konzentration eines Schädlingsbekämpfungsmittels genutzt und bei $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ und einer Licht-Dunkel-Periode von 16 Stunden zu 8 Stunden inkubiert. Das radiale Wachstum wurde zwölf Tage nach der Inokulation gemessen. Anschließend wurde zur Bestimmung der Konidienanzahl eine 177 mm^2 große Kreisscheibe aus der Mitte einer sporulierenden Kolonie mit einem Korkbohrer ausgeschnitten und in ein Reagenzglas überführt, welches eine mit 0,1 % Tween80 versetzte sterile Wasserlösung enthielt.

Der Inhalt des Reagenzglases wurde zunächst 20 Sekunden mittels eines Schüttlers durchmischt und danach für fünf Minuten in einem Ultraschallbad des Typs RK255S mit einer Vibrationsfrequenz von 35 kHz (Bandelin, Berlin) behandelt, um die Sporen von der Agarscheibe zu lösen. Die Konidienanzahl wurde nach Verdünnung der Stammlösung mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer (mit einer Tiefe von 0,2 mm und einer Fläche von $0,0625 \text{ mm}^2$) bestimmt.

1.2.5 Berechnung der Kompatibilität

Alves *et al.* (1998) haben ein Modell zur Klassifizierung von toxikologischen Effekten von Chemikalien auf entomopathogene Pilze vorgeschlagen, die *in vitro* auf festem Medium wachsen. Dieses Modell berücksichtigt die Konidienanzahl (KA) und das vegetative Wachstum (VW) der Pilze auf Medien, die mit den Testchemikalien (Schädlingsbekämpfungsmittel) angereichert sind, im Vergleich zur Entwicklung von Pilzen auf unbehandelten Kontrollmedien. Die Toxizitäts-(T-)Werte werden mit folgender Formel berechnet: $T = (20 \times [VW] + 80 \times [KA])/100$. Anhand der T-Werte haben Alves *et al.* (1998) folgende Klassifizierung vorgeschlagen: $T > 60$ kompatibel, $46 \leq T \leq 60$ moderat toxisch, $31 \leq T \leq 45$ toxisch und $T \leq 30$ sehr toxisch.

1.2.6 Statistik

Die statistische Analyse wurde mit PASW 17 (Predictive Analysis SoftWare, SPSS Inc.) durchgeführt. Die Daten der Keimraten wurden transformiert (Arcus-Sinus-Quadratwurzel-Transformation) und anschließend mit einer ANOVA analysiert, wobei die Mittelwerte mit Hilfe des Tukey-Tests separiert wurden. Die Mittelwerte des vegetativen Wachstums der Pilze bei verschiedenen Konzentrationen eines Schädlingsbekämpfungsmittels wurden untereinander mit dem U-Test nach Mann und Whitney verglichen. Die Konidienanzahl wurde mit einer ANOVA analysiert, wobei die Mittelwerte ebenfalls mit Hilfe des Tukey-Tests separiert wurden. Das Signifikanzniveau wurde für alle oben genannten Tests mit $p < 0,05$ angenommen. Unterschiede in den Dosis-Wirkungs-Kurven eines Schädlingsbekämpfungsmittels für beide Pilzstämme wurden für Keimung, Wachstum und Konidienanzahl mittels einer univariaten Varianzanalyse ermittelt. Das Signifikanzniveau für die univariate Varianzanalyse wurde, da keine Homogenität vorlag, mit $p < 0,01$ angenommen (Bühl und Zöfel 2000).

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Dimethylsulfoxid

Die Keimung, das vegetative Wachstum und die Konidienbildung von MA-K und MA-7 wurden von DMSO konzentrationsabhängig beeinträchtigt. Die Keimrate betrug zwischen 89,3 % und 99,0 % bei DMSO-Konzentrationen von 4 % oder weniger. 6 % und 10 % DMSO hatten im Vergleich zur Kontrolle einen signifikant negativen Einfluss auf beide *M. anisopliae*-Stämme ($F_{5,66} = 261$, $p < 0,001$ [MA-K], $F_{5,66} = 125$, $p < 0,001$ [MA-7]). Der Vergleich der Keimraten beider Stämme miteinander ergab keine signifikanten Unterschiede

($F_{5,132} = 1,00$, $p = 0,42$). Das vegetative Wachstum hingegen wurde nur bei 1 % DMSO nicht beeinflusst (für DMSO > 1 %: $U = 0,00$, $p < 0,001$ [MA-K], $U \leq 4,50$, $p < 0,001$ [MA-7]). Bei 10 % DMSO konnte nach zwölf Tagen kein Wachstum festgestellt werden. MA-7 wurde in den höheren Konzentrationen stärker negativ beeinflusst als MA-K ($F_{5,174} = 7,76$, $p < 0,001$). Auch die Menge an gebildeten Konidien verringerte sich mit steigender DMSO-Konzentration und war nur in der geringsten DMSO-Konzentration auf dem Niveau der Kontrolle ($F_{5,86} = 150$, $p < 0,001$ [MA-K], $F_{5,88} = 85,5$, $p < 0,001$ [MA-7]). MA-7 wurde stärker beeinträchtigt als MA-K ($F_{5,174} = 15,3$, $p < 0,001$) (Abb. 1). T-Werte kleiner als 17 zeigten die hohe Toxizität von DMSO-Konzentrationen über 2 % auf beide *M. anisopliae*-Stämme an. Die beiden geringsten DMSO-Konzentrationen (1 % und 2 %) waren mit beiden Stämmen kompatibel (Tab. 1).

Tab. 1: T-Werte und Klassifizierung (nach Alves *et al.* [1998]) der toxikologischen Effekte der verschiedenen DMSO-Konzentrationen auf MA-K und MA-7.

Konzentration	MA-K		MA-7	
	T-Wert	Klassifizierung	T-Wert	Klassifizierung
1 %	91,7	K	90,3	K
2 %	64,6	K	65,4	K
4 %	12,1	ST	16,4	ST
6 %	5,7	ST	5,8	ST
10 %	0,7	ST	1,6	ST

T-Wert > 60: K (kompatibel) und T-Wert \leq 30: ST (sehr toxisch).

1.3.2 NeemAzal

Es konnten keine signifikanten Effekte auf die Keimung festgestellt werden, wenn MA-K oder MA-7 auf mit NeemAzal angereichertem Medium kultiviert wurde ($F_{5,66} = 2,40$, $p = 0,047$ [MA-K], $F_{5,66} = 1,94$, $p = 0,10$ [MA-7]) und es gab auch keine Unterschiede zwischen den beiden *M. anisopliae*-Stämmen ($F_{5,132} = 2,00$, $p = 0,83$). Die mittlere Keimrate war in allen Konzentrationen größer als 98,2 %. Die Koloniegröße von MA-K wurde allerdings von 200 ppm NeemAzal signifikant negativ beeinflusst ($U = 63,5$, $p = 0,024$). Das Wachstum von MA-7 hingegen wurde nur von 8 ppm nicht signifikant negativ beeinflusst ($U \leq 57,0$, $p \leq 0,012$). Es gab im direkten Vergleich der beiden Pilzstämme keine signifikanten Unterschiede ($F_{5,178} = 2,12$, $p = 0,65$). Auf die Konidienproduktion von MA-K hatte NeemAzal keinen Einfluss. ($F_{5,89} = 1,80$, $p = 0,12$). Die Konidienbildung von MA-7 wurde hingegen von Konzentrationen größer als 8 ppm eingeschränkt ($F_{5,89} = 5,08$, $p < 0,001$) (Abb. 2). Der direkte Vergleich beider Stämme ergab aber auch hier keinen unterschiedlichen

Effekt von NeemAzal auf die Stämme ($F_{5,178} = 1,20$, $p = 0,31$). Die T-Werte variierten zwischen 74 und 107, woraus sich eine Kompatibilität aller Konzentrationen mit beiden *M. anisopliae*-Stämmen ergab (Tab. 2).

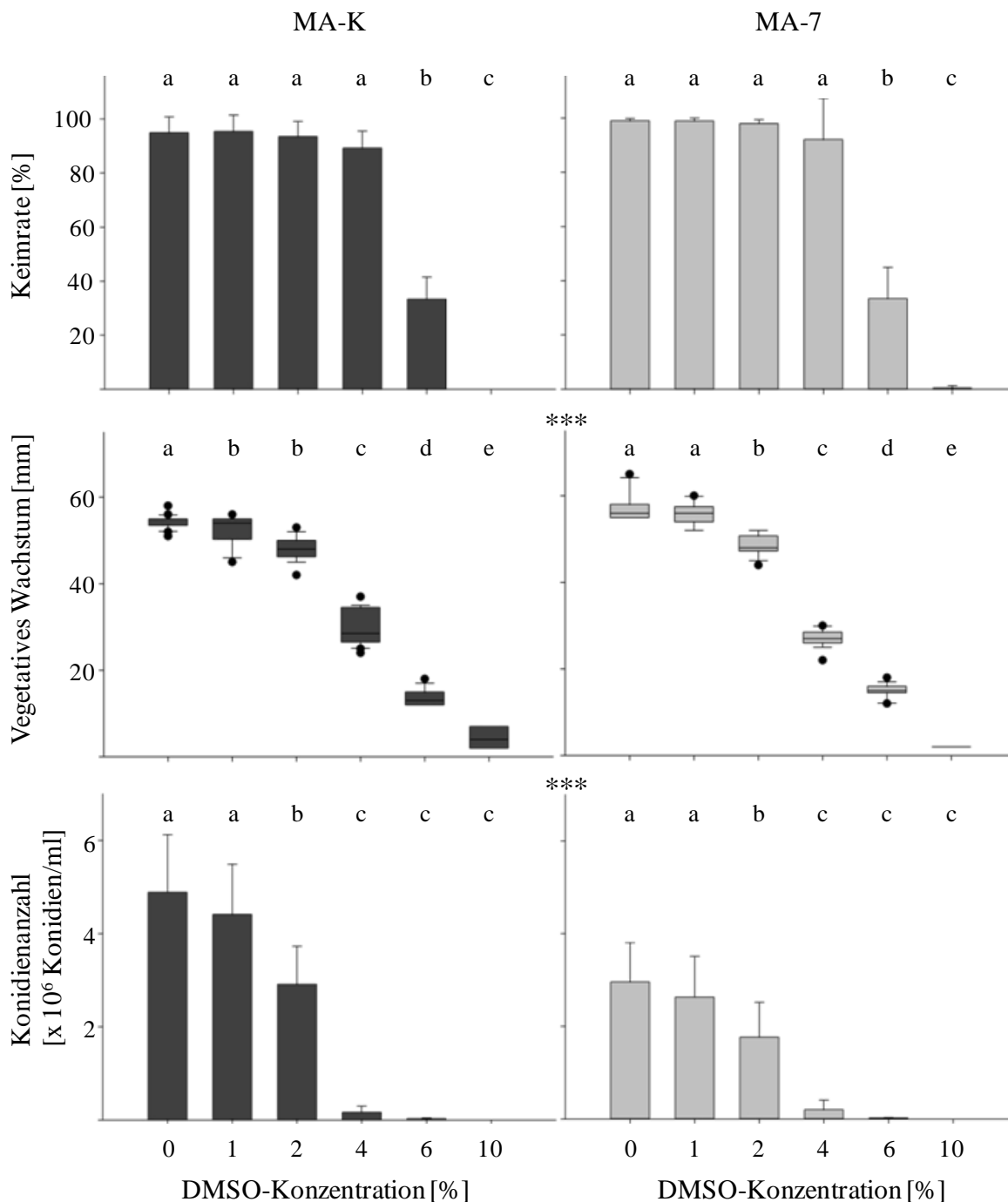


Abb. 1: Keimung ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$), Koloniedurchmesser (Median, 25/75 Perzentile, 10/90 Perzentile, Punkte zeigen Ausreißer an, $n = 12 - 16$) und Konidienanzahl ($\bar{x} \pm s$, $n = 12 - 16$) von MA-K (dunkelgraue Balken/Boxplots) und MA-7 (hellgraue Balken/Boxplots) in Abhängigkeit verschiedener DMSO-Konzentrationen. Balken/Boxplots mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Pilzstämmen werden durch Sternchen (*) = $p < 0,001$) angezeigt.**

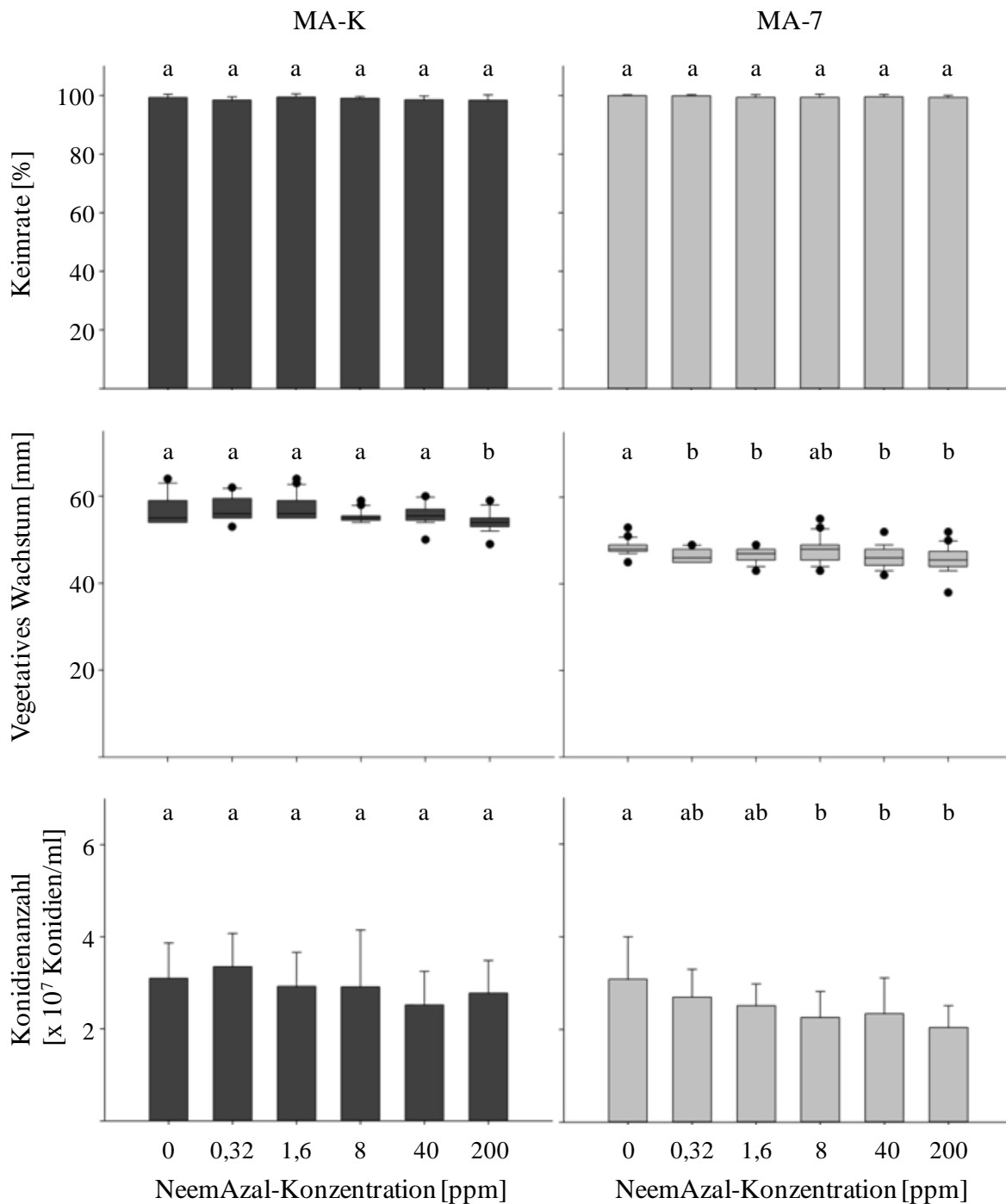


Abb. 2: Keimung ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$), Koloniedurchmesser (Median, 25/75 Perzentile, 10/90 Perzentile, Punkte zeigen Ausreißer an, $n = 16$) und Konidienanzahl ($\bar{x} \pm s$, $n = 16$) von MA-K (dunkelgraue Balken/Boxplots) und MA-7 (hellgraue Balken/Boxplots) in Abhängigkeit verschiedener NeemAzal-Konzentrationen. Balken/Boxplots mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich.

Tab. 2: T-Werte und Klassifizierung (nach Alves *et al.* [1998]) der toxikologischen Effekte verschiedener Konzentrationen von Schädlingsbekämpfungsmitteln auf MA-K und MA-7. Werte der Kombination von Permethrin und Imidacloprid (im Verhältnis 5:1) wurden anhand der Permethrin-Konzentration einsortiert.

Konzentration	0,32 ppm		1,6 ppm		8 ppm		40 ppm		200 ppm		
	MA-	T-Wert	Klassi- fizierung	T-Wert	Klassi- fizierung	T-Wert	Klassi- fizierung	T-Wert	Klassi- fizierung	T-Wert	Klassi- fizierung
NeemAzal	K	107,0	K	96,1	K	95,5	K	85,7	K	90,2	K
	7	92,6	K	87,8	K	80,0	K	82,9	K	73,8	K
Permethrin	K	108,2	K	96,6	K	100,4	K	101,4	K	89,0	K
	7	138,7	K	117,5	K	118,7	K	92,7	K	106,6	K
Imidacloprid	K	96,9	K	102,9	K	81,9	K	82,7	K	94,2	K
	7	110,1	K	107,1	K	119,2	K	106,9	K	104,6	K
Permethrin & Imidacloprid	K	-	-	89,2	K	87,4	K	91,9	K	85,2	K
	7	-	-	93,9	K	69,1	K	68,3	K	69,2	K
Fipronil	K	106,5	K	85,2	K	86,9	K	67,2	K	66,8	K
	7	104,1	K	93,0	K	71,2	K	55,7	MT	57,4	MT
Amitraz	K	91,6	K	87,4	K	71,6	K	82,4	K	65,5	K
	7	93,8	K	71,7	K	70,7	K	74,9	K	69,1	K

T-Wert > 60: K (kompatibel), $46 \leq$ T-Wert \leq 60: MT (moderat toxisch)

1.3.3 Permethrin

Die Keimung von MA-K wurde von Permethrin negativ beeinflusst. Allerdings keimten im Vergleich zur Kontrolle nur auf dem Medium signifikant weniger Konidien, das mit der höchsten Permethrin-Konzentration versetzt war ($F_{5,66} = 5,35$, $p < 0,001$). Signifikant weniger Konidien von MA-7 keimten auf Medium, welches mit mehr als 0,32 ppm versetzt war ($F_{5,66} = 6,84$, $p < 0,001$). Die Keimung beider *M. anisopliae*-Stämme wurde aber im Verhältnis gleich beeinflusst ($F_{5,132} = 1,27$, $p = 0,28$). Ähnlich verhielt es sich mit dem vegetativen Wachstum, auch hier wurde nur durch die höheren Konzentrationen (ab 1,6 ppm) eine signifikante Reduktion des vegetativen Wachstums festgestellt ($U < 34,5$, $p < 0,001$ [MA-K], $U < 56,5$, $p < 0,006$ [MA-7]), aber keine Unterschiede zwischen den Stämmen ($F_{5,180} = 0,89$, $p = 0,49$). Auf die Konidienbildung von MA-K hatte Permethrin hingegen keinen Einfluss ($F_{5,89} = 0,91$, $p = 0,47$). Es wurden aber auf dem mit 0,32 ppm Permethrin angereicherten Medium mehr Konidien von MA-7 gebildet als auf dem Kontrollmedium ($F_{5,90} = 4,24$, $p = 0,002$) (Abb. 3). Es ergaben sich keine Unterschiede zwischen den MA-K und MA-7 ($F_{5,179} = 0,84$, $p = 0,52$). Die T-Werte waren für beide Stämme und alle Konzentrationen größer als 89. Damit können alle Permethrin-Konzentrationen als kompatibel mit beiden *M. anisopliae*-Stämmen eingestuft werden (Tab. 2).

1.3.4 Imidacloprid

Die Keimung von MA-K wurde nur von 8 ppm Imidacloprid signifikant beeinflusst ($F_{5,66} = 2,62$, $p = 0,03$). Bei der Keimung von MA-7 konnte hingegen kein Effekt beobachtet werden ($F_{5,66} = 2,57$, $p = 0,04$). Aus dem Vergleich der Keimraten von beiden *M. anisopliae*-Stämmen lässt sich schließen, dass Imidacloprid auf beide Stämme einen ähnlichen Effekt hatte ($F_{5,132} = 0,83$, $p = 0,53$). Auch das vegetative Wachstum von MA-K wurde von keiner Konzentration gehemmt ($U \geq 99,5$, $p = 0,3$), aber Imidacloprid hatte einen positiven Effekt auf das vegetative Wachstum von MA-7 (ausgenommen: 1,6 und 8 ppm) ($U < 74,5$, $p \leq 0,04$). Verschiedene Konzentrationen erhöhten das Wachstum um bis zu 10 % (200 ppm). Das Wachstum von MA-7 wurde konzentrationsabhängig tendenziell stärker positiv beeinflusst als das von MA-K ($F_{5,180} = 2,33$, $p = 0,044$). Imidacloprid hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der gebildeten Konidien beider Stämme ($F_{5,90} = 3,29$, $p = 0,009$ [MA-K], $F_{5,90} = 0,60$, $p = 0,70$ [MA-7]) (Abb. 4). Die Konidienbildung von MA-7 war geringer als die von MA-K ($F_{5,180} = 2,47$, $p = 0,034$). Die T-Werte schwankten zwischen 82 (bei 8 ppm) und 103 (1,6 ppm) für MA-K und waren für MA-7 immer größer 100. Daraus lässt sich eine Kompatibilität beider *M. anisopliae*-Stämme mit allen Konzentrationen ableiten (Tab. 2).

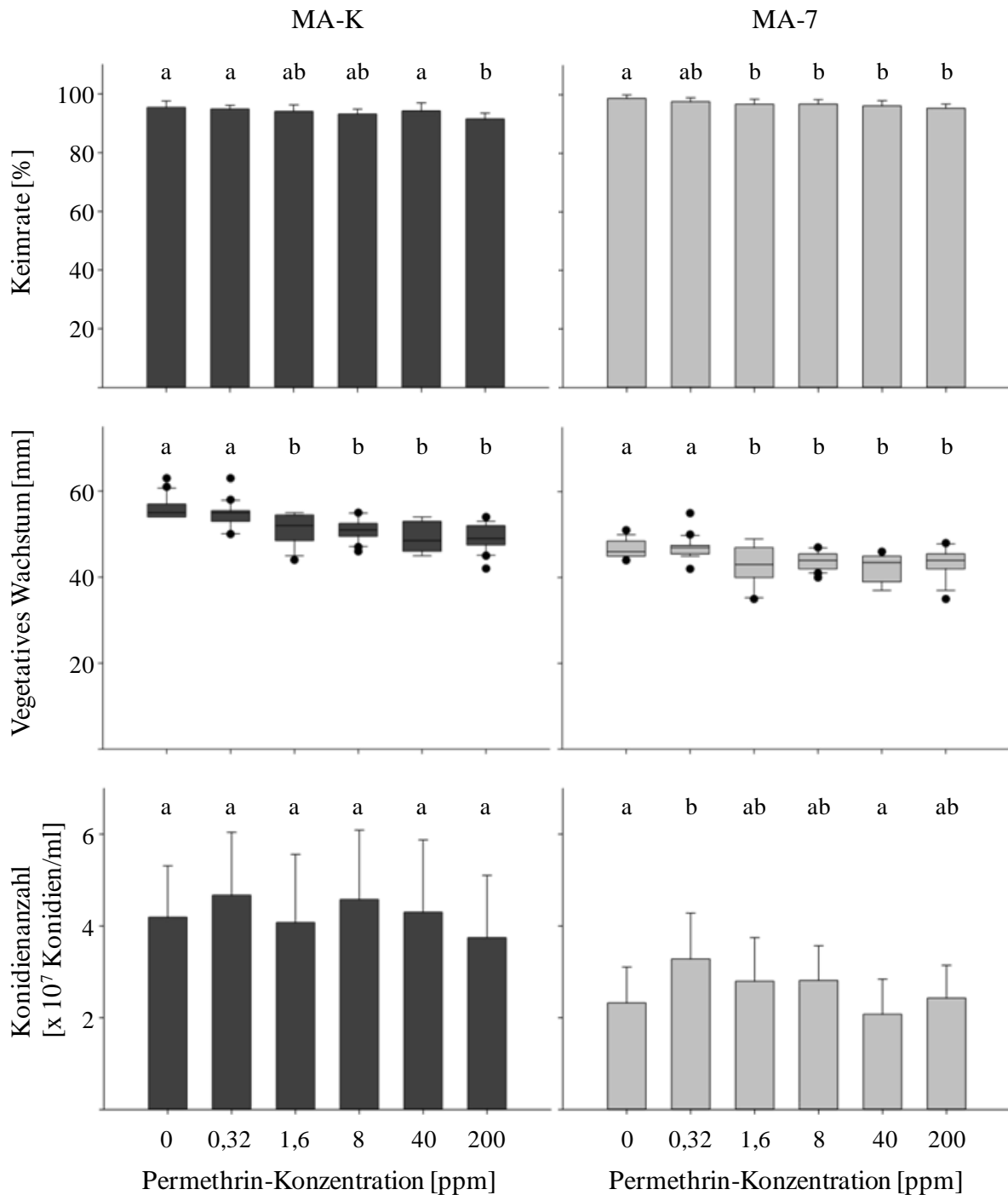


Abb. 3: Keimung ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$), Koloniedurchmesser (Median, 25/75 Perzentile, 10/90 Perzentile, Punkte zeigen Ausreißer an, $n = 16$) und Konidienanzahl ($\bar{x} \pm s$, $n = 16$) von MA-K (dunkelgraue Balken/Boxplots) und MA-7 (hellgraue Balken/Boxplots) in Abhängigkeit verschiedener Permethrin-Konzentrationen. Balken/Boxplots mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich.

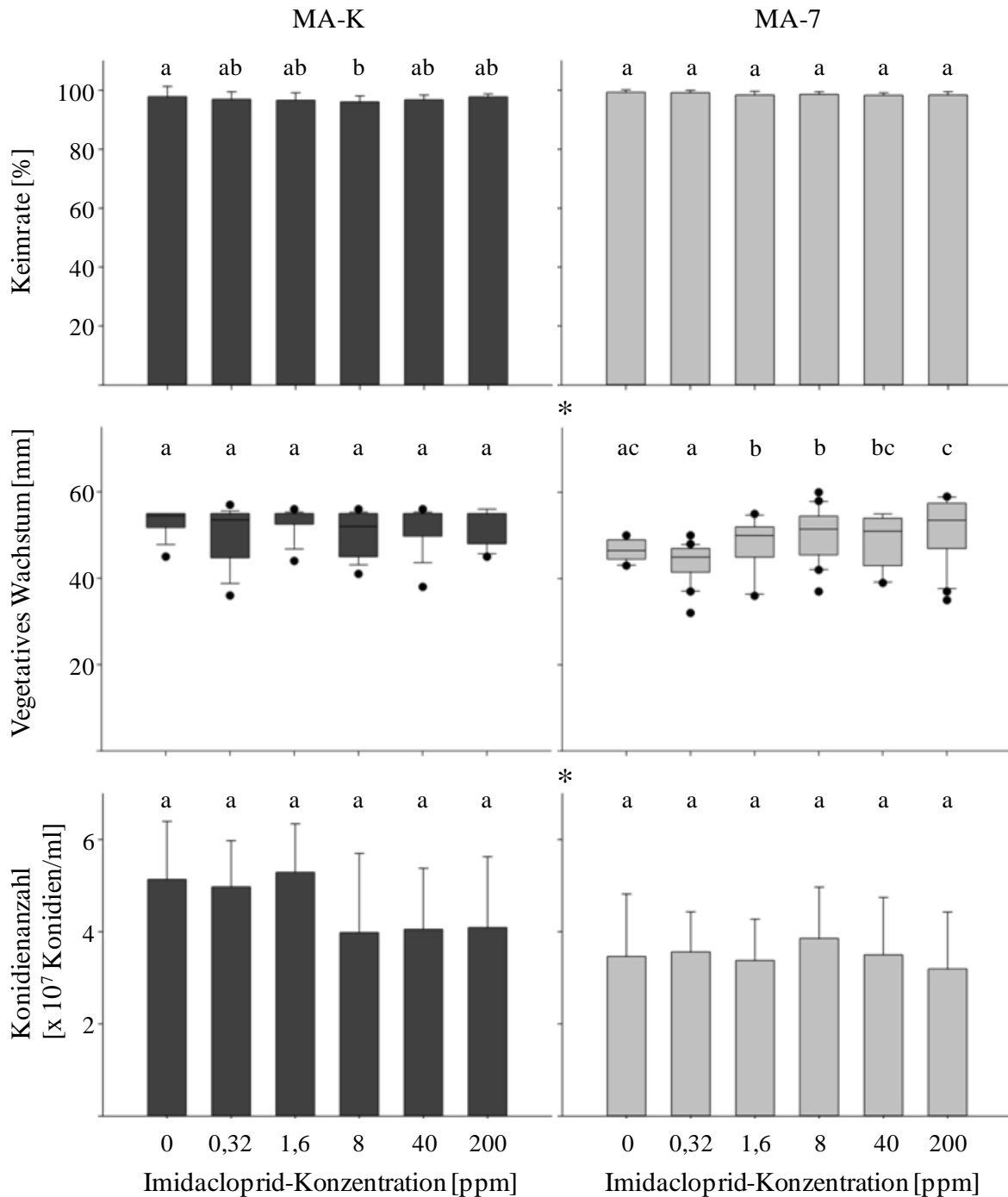


Abb. 4: Keimung ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$), Koloniedurchmesser (Median, 25/75 Perzentile, 10/90 Perzentile, Punkte zeigen Ausreißer an, $n = 16$) und Konidienanzahl ($\bar{x} \pm s$, $n = 16$) von MA-K (dunkelgraue Balken/Boxplots) und MA-7 (hellgraue Balken/Boxplots) in Abhängigkeit verschiedener Imidacloprid-Konzentrationen. Balken/Boxplots mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Pilzstämmen werden durch Sternchen (* = $0,05 < p \leq 0,01$) angezeigt.

1.3.5 Kombination von Permethrin und Imidacloprid

Keine der kombinierten Konzentrationen von Permethrin und Imidacloprid hatte einen Effekt auf die Keimung der beiden Stämme ($F_{4,55} = 0,41$, $p = 0,80$ [MA-K], $F_{4,55} = 0,24$, $p = 0,91$ [MA-7]) und der direkte Vergleich der Pilzstämme ergab keine signifikanten Unterschiede ($F_{4,110} = 3,57$, $p = 0,84$). Hingegen wirkten sich alle getesteten Konzentrationen negativ auf das vegetative Wachstum von MA-K und MA-7 aus ($U < 27,0$, $p < 0,001$ [MA-K], $U < 14,5$, $p < 0,001$ [MA-7]). Auch hier gab es keinen Unterschied zwischen den beiden Stämmen ($F_{4,148} = 1,94$, $p = 0,11$). Die Konidienbildung von MA-K wurde von keiner der getesteten Konzentrationen beeinflusst ($F_{4,74} = 0,86$, $p = 0,49$). Die Konidienbildung von MA-7 hingegen wurde durch alle Kombinationen (mit Ausnahme der geringsten Konzentration von Permethrin und Imidacloprid) im Vergleich zur Kontrolle herabgesetzt ($F_{4,74} = 6,38$, $p < 0,001$) (Abb. 5). Es waren aber keine Unterschiede zwischen den beiden *M. anisopliae*-Stämmen bezüglich der Abnahme der Konidienanzahl zu finden ($F_{4,148} = 1,89$, $p = 0,12$). T-Werte zeigten eine Kompatibilität aller Konzentrationen mit MA-K ($T > 85$) und MA-7 an, wobei die T-Werte der höheren drei Konzentrationen für MA-7 an der unteren Grenze ($T \sim 68$) lagen (Tab. 2).

1.3.6 Fipronil

Die Keimung von MA-K wurde signifikant von Fipronil beeinträchtigt ($F_{5,66} = 7,64$, $p < 0,001$). Die Keimrate lag zwischen 82,7 % (200 ppm) und 95,4 % (Kontrolle). Allerdings keimten nur die Konidien auf Medium, welches mit 200 ppm versetzt worden war, schlechter als die auf Kontrollmedium. Die Keimung von MA-7 wurde von Konzentrationen größer bzw. gleich 1,6 ppm signifikant gehemmt ($F_{5,66} = 24,1$, $p < 0,001$). Die Unterschiede zwischen den beiden *M. anisopliae*-Stämmen waren aber nicht signifikant ($F_{5,132} = 0,17$, $p = 0,97$). Das vegetative Wachstum von beiden Stämmen wurde ebenfalls konzentrationsabhängig signifikant beeinträchtigt ($U < 176$, $p < 0,03$ [MA-K], $U < 71,0$, $p < 0,001$ [MA-K]). Das Wachstum wurde im Vergleich zur Kontrolle um 4 % bis 33 % reduziert. Dabei wurde MA-7 stärker beeinflusst als MA-K ($F_{5,233} = 6,08$, $p < 0,001$). Kolonien von MA-K produzierten im Vergleich zur Kontrolle weniger Konidien, wenn sie auf Medium wuchsen, das mit 40 oder 200 ppm versetzt war ($F_{5,121} = 5,32$, $p < 0,001$). Wohingegen Kolonien von MA-7 im Vergleich zur Kontrolle bereits auf Medium mit einer Konzentration von mindestens 8 ppm Fipronil signifikant weniger Konidien produzierten ($F_{5,112} = 13,57$, $p < 0,001$) (Abb. 6). Auch hier waren die Unterschiede der beiden Stämme nicht signifikant ($F_{5,233} = 0,89$, $p = 0,49$).

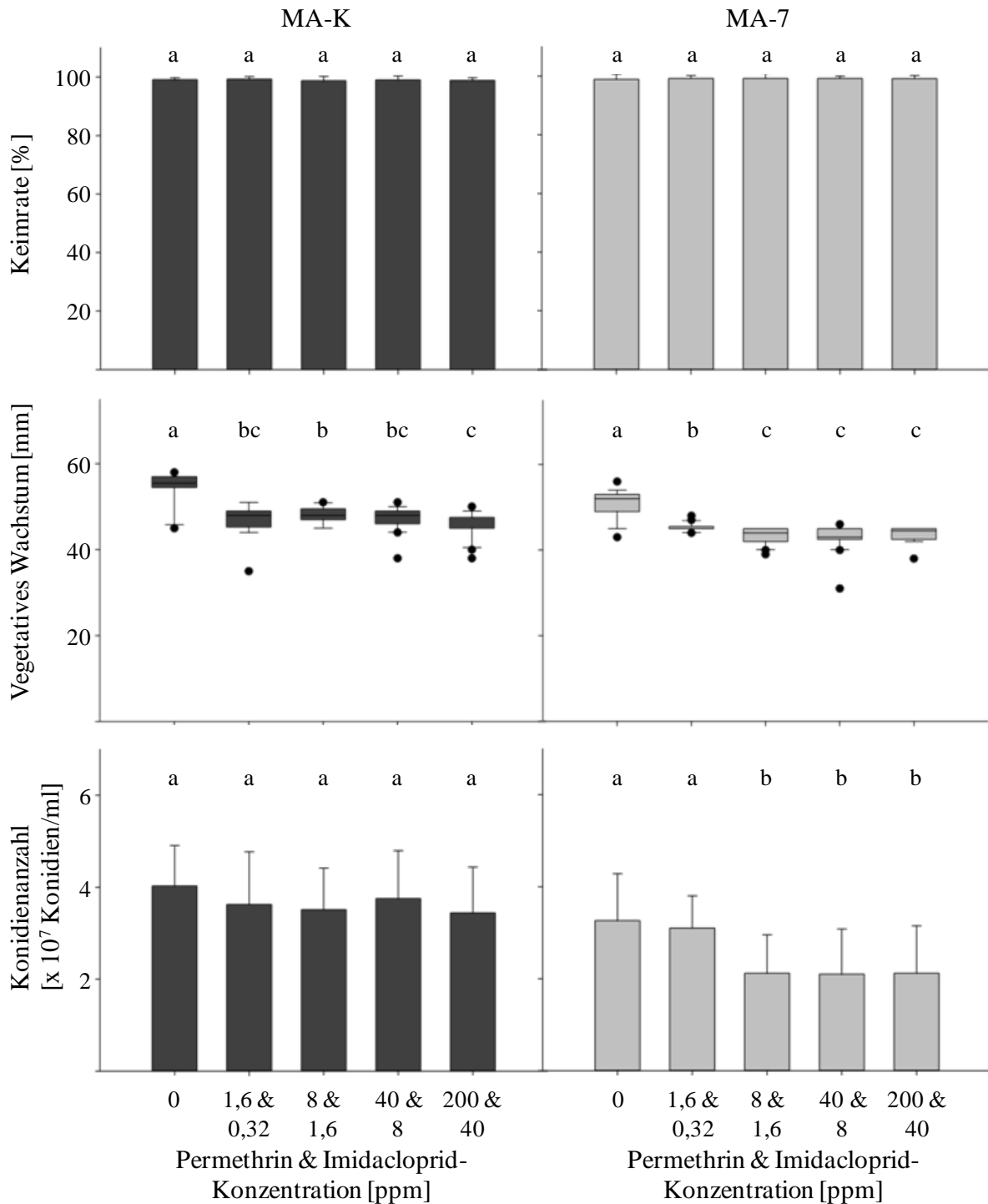


Abb. 5: Keimung ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$), Koloniedurchmesser (Median, 25/75 Perzentile, 10/90 Perzentile, Punkte zeigen Ausreißer an, $n = 16$) und Konidienanzahl ($\bar{x} \pm s$, $n = 16$) von MA-K (dunkelgraue Balken/Boxplots) und MA-7 (hellgraue Balken/Boxplots) in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationskombinationen von Permethrin und Imidacloprid (im Verhältnis 5:1). Balken/Boxplots mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich.

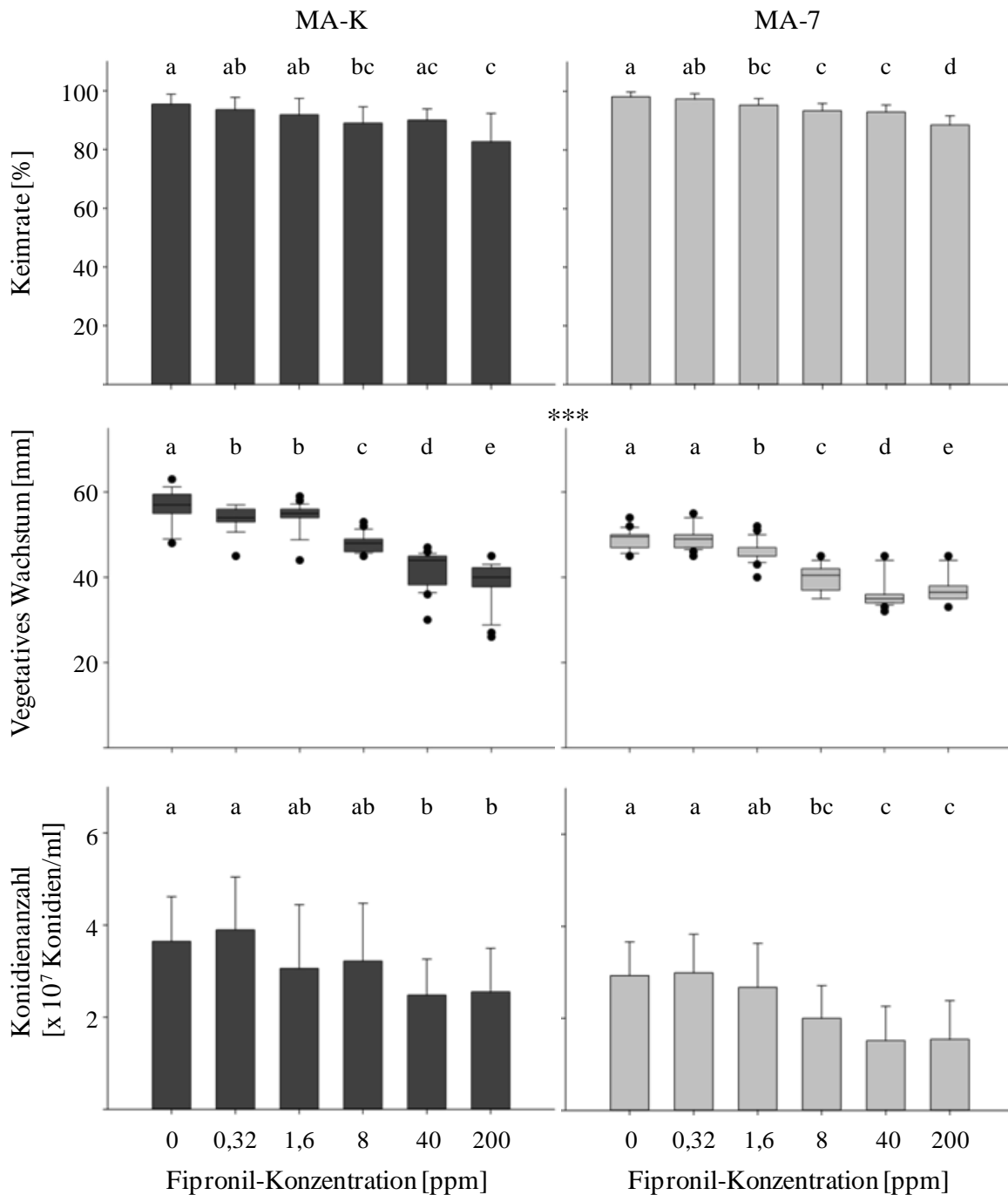


Abb. 6: Keimung ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$), Koloniedurchmesser (Median, 25/75 Perzentile, 10/90 Perzentile, Punkte zeigen Ausreißer an, $n = 16$) und Konidienanzahl ($\bar{x} \pm s$, $n = 16$) von MA-K (dunkelgraue Balken/Boxplots) und MA-7 (hellgraue Balken/Boxplots) in Abhängigkeit verschiedener Fipronil-Konzentrationen. Balken/Boxplots mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Pilzstämmen werden durch Sternchen (*) = $p < 0,001$) angezeigt.**

Die T-Werte fielen mit ansteigender Fipronil-Konzentration ab und lagen zwischen 107 (0,32 ppm) und 67 (200 ppm) für MA-K und zwischen 104 (0,32 ppm) und 56 (40 ppm) für MA-7. Damit sind die zwei höchsten Konzentrationen als moderat toxisch für MA-7

einzustufen, während alle anderen Konzentrationen als kompatibel für beide Stämme anzusehen sind (Tab. 2). Wird hingegen Medium mit 1 % DMSO als Kontrolle verwendet und werden mit Werten auf Basis dieses Kontrollmediums neue T-Werte berechnet, sind auch 40 ppm ($T \sim 64$) und 200 ppm ($T \sim 65$) mit MA-7 als kompatibel einzustufen.

1.3.7 Amitraz

Keine getestete Konzentration von Amitraz hatte einen Einfluss auf die Keimung von MA-K und MA-7 ($F_{5,66} = 0,49$, $p = 0,78$ [MA-K], $F_{5,66} = 0,68$, $p = 0,64$ [MA-7]). Die mittlere Keimrate war bei allen Konzentrationen größer als 97,3 %. Damit gab es auch zwischen den beiden Stämmen keinen Unterschied ($F_{5,132} = 0,89$, $p = 0,48$). Amitraz hatte einen positiven Effekt auf das vegetative Wachstum von MA-K. So erhöhten Konzentrationen von 1,6 ppm und 40 ppm das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle ($U = 72,5$, $p = 0,035$ [1,6 ppm], $U = 65,0$, $p = 0,017$ [40 ppm]). Auf das vegetative Wachstum von MA-7 hatte Amitraz dagegen keinen Effekt ($U \geq 77,5$, $p \geq 0,056$). Der Vergleich der Wachstums-Kurven von MA-K und MA-7 ergab, dass MA-K tendenziell besser auf mit Amitraz angereichertem Medium wuchs als MA-7 ($F_{5,180} = 2,17$, $p = 0,06$). Die Konidienproduktion von MA-K wurde nur durch 200 ppm signifikant eingeschränkt ($F_{5,90} = 2,52$, $p = 0,035$), während die Konidienbildung von MA-7 durch Konzentrationen von 1,6 ppm oder mehr signifikant (bis zu 43 % weniger als in der Kontrolle) gehemmt wurde ($F_{5,90} = 9,94$, $p < 0,001$) (Abb. 7). Die Unterschiede der beiden Pilzstämme waren aber nicht signifikant ($F_{5,180} = 0,22$, $p = 0,96$). Alle Konzentrationen sind als kompatibel mit MA-K und MA-7 einzustufen, auch wenn die T-Werte der höchsten Konzentration mit $T = 66$ (MA-K) und $T = 69$ (MA-7) an der Grenze zum moderat toxischen liegen (Tab. 2).

1.3.8 Etoxazol

Die Keimung von MA-K und MA-7 wurde durch keine Etoxazol-Konzentration negativ beeinflusst ($F_{6,77} = 1,29$, $p = 0,27$ [MA-K], $F_{6,77} = 1,10$, $p = 0,37$ MA-7]) und es gab keine Unterschiede zwischen den beiden *M. anisopliae*-Stämmen ($F_{6,154} = 1,15$, $p = 0,33$). Das vegetative Wachstum wurde nur durch höhere Konzentrationen (20 und 100 ppm) um bis zu 33 % reduziert ($U < 19,5$, $p < 0,001$ [MA-K], $U = 0,00$, $p < 0,001$ [MA-7]). Auch hier unterschieden sich MA-K und MA-7 nicht voneinander ($F_{6,210} = 0,69$, $p = 0,66$). Die Konidienanzahl der Kolonien von MA-K, die auf Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen wuchsen, unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($F_{6,105} = 0,80$, $p = 0,57$). Die Konidienbildung von MA-7 wurde stärker eingeschränkt mit bis zu 63,6 %

(100 ppm) weniger gebildeten Konidien im Vergleich zur Kontrolle ($F_{6,105} = 9,10$, $p < 0,001$) (Abb. 8). Dennoch unterschied sich die Anzahl der gebildeten Konidien der beiden Pilzstämme nicht voneinander ($F_{6,210} = 1,17$, $p = 0,33$). T-Werte von MA-K lagen zwischen 79 und 88, was auf eine Kompatibilität aller Konzentrationen mit MA-K schließen ließ. Die T-Werte für MA-7 hingegen waren deutlich geringer und lagen zwischen 43 und 70. Damit war eine schwache Kompatibilität der geringen Konzentrationen gegeben. Jedoch mussten 20 ppm bzw. 100 ppm als moderat toxisch bzw. toxisch gegenüber MA-7 eingestuft werden (Tab. 3). Wird hingegen Medium mit 1 % DMSO als Kontrolle verwendet und werden mit Werten auf Basis dieses Kontrollmediums neue T-Werte berechnet, sind auch 20 ppm ($T \sim 93$) und 100 ppm ($T \sim 76$) mit MA-7 kompatibel.

Tab. 3: T-Werte und Klassifizierung (nach Alves *et al.* [1998]) der toxikologischen Effekte der verschiedenen Konzentrationen von Etoxazol auf MA-K und MA-7.

Konzentration [ppm]	MA-K		MA-7	
	T-Wert	Klassifizierung	T-Wert	Klassifizierung
0,032	86,9	K	65,5	K
0,16	84,3	K	70,6	K
0,8	81,9	K	64,3	K
4	88,1	K	61,6	K
20	79,3	K	56,5	MT
100	87,4	K	43,3	T

T-Wert > 60: K (kompatibel) $46 \leq T\text{-Wert} \leq 60$: MT (moderat toxisch) und $31 \leq T\text{-Wert} \leq 45$: T (toxisch).

1.4 Diskussion

Entomopathogene Pilze sind eine vielversprechende Organismen-Gruppe für die biologische Schädlingsbekämpfung. Ihre Wirksamkeit muss aber verbessert werden, um die Effizienz der biologischen Kontrolle zu optimieren. Eine Effizienzsteigerung kann durch die kombinierte Anwendung von Pilzkonidien und geringen Konzentrationen von Schädlingsbekämpfungsmitteln erreicht werden, aber nur sofern die eingesetzten Schädlingsbekämpfungsmittel die Lebensfähigkeit, die Entwicklung und die Virulenz des entomopathogenen Pilzes nicht negativ beeinflussen. Eine Hemmung der Keimung, die den essenziellen Schritt zur Etablierung einer Infektion bedeutet, kann die Effektivität des Pilzes stark beeinträchtigen (da Silva und Neves 2005, Anderson und Roberts 1983). Die Schädlingsbekämpfungsmittel können aber auch einen Effekt auf das vegetative Wachstum oder die Konidiogenese haben. Die Geschwindigkeit und Intensität des vegetativen

Wachstums (gekoppelt mit Toxinproduktion) bestimmt nach der erfolgreichen Keimung die Virulenz des Pilzes. Nach dem Tod des Wirtes wächst das Myzel saprophytisch aus und beeinflusst das endgültige Virulenzpotenzial über sekundäre Infektionen in der Wirts-

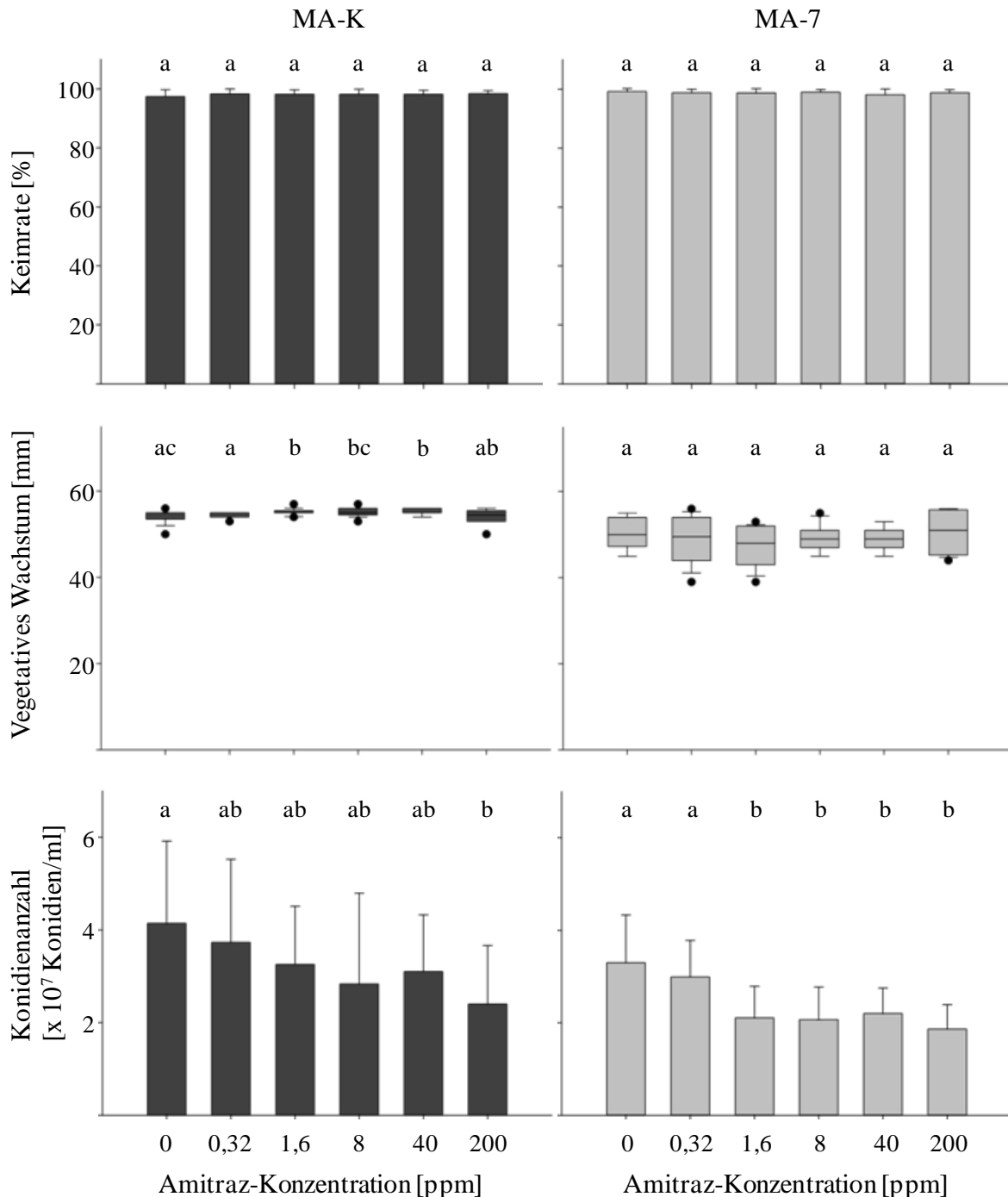


Abb. 7: Keimung ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$), Koloniedurchmesser (Median, 25/75 Perzentile, 10/90 Perzentile, Punkte zeigen Ausreißer an, $n = 16$) und Konidienanzahl ($\bar{x} \pm s$, $n = 16$) von MA-K (dunkelgraue Balken/Boxplots) und MA-7 (hellgraue Balken/Boxplots) in Abhängigkeit verschiedener Amitraz-Konzentrationen. Balken/Boxplots mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich.

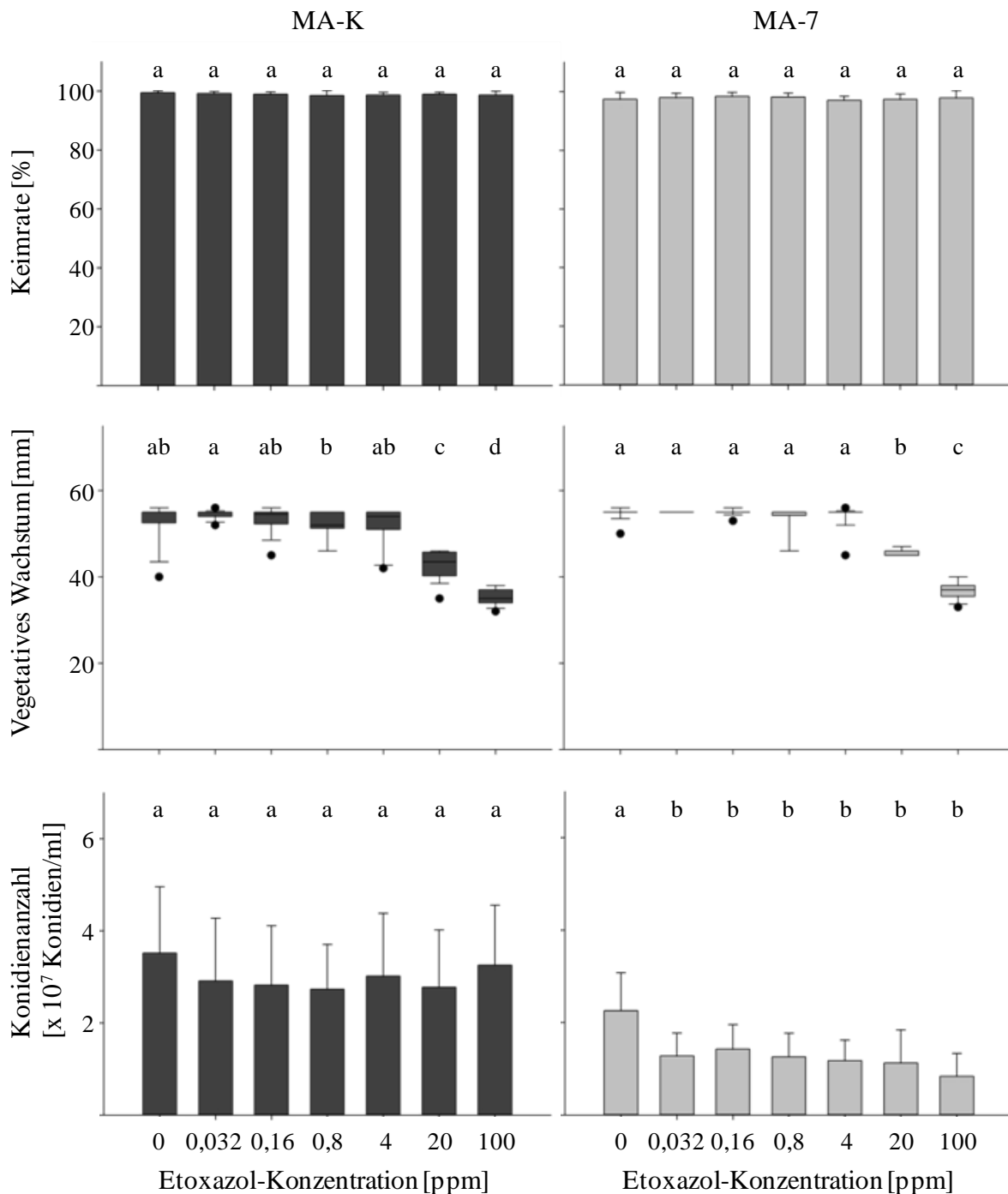


Abb. 8: Keimung ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$), Koloniedurchmesser (Median, 25/75 Perzentile, 10/90 Perzentile, Punkte zeigen Ausreißer an, $n = 16$) und Konidienanzahl ($\bar{x} \pm s$, $n = 16$) von MA-K (dunkelgraue Balken/Boxplots) und MA-7 (hellgraue Balken/Boxplots) in Abhängigkeit verschiedener Etoxazol-Konzentrationen. Balken/Boxplots mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich.

population über die Freisetzung von Konidien durch das Myzel auf infizierten Kadavern (Wraight *et al.* 2007, Alves 1998, Samson *et al.* 1988). Folglich sollten, wie in der vorliegenden Studie geschehen, die Keimung, das vegetative Wachstum und die Konidienbildung als Parameter untersucht werden, um Konzentrationen von Schädlings-

bekämpfungsmitteln zu bestimmen, die mit den entomopathogenen Pilzen sicher (in Bezug auf Lebensfähigkeit und Virulenz des Pilzes) eingesetzt werden können. Das benutzte Testsystem betrachtet den Fall, dass der Pilz während seiner gesamten Entwicklung (von der Keimung bis zur Sporulation) in permanentem Kontakt zum Schädlings-bekämpfungsmittel steht, was in Feldversuchen nicht der Fall sein dürfte (Neves *et al.* 2001). Da das vegetative Wachstum *in vivo* im Inneren des Arthropoden geschieht, sollte der Pilz mit dem Schädlingsbekämpfungsmittel kaum in Kontakt kommen bzw. die Konzentration mit der der Pilz in Kontakt kommt, sollte geringer sein als die Konzentrationen, die in *in vitro* Versuchen getestet werden (da Silva und Neves 2005). Auch der Einfluss auf die Konidienbildung sollte geringer sein als *in vitro*, da das Myzel erst eine Weile nach der Applikation der Wirkstoffe auswächst. Somit ist anzunehmen, dass bei einer Kompatibilität in den vorliegenden Versuchen das Risiko von unerwünschten Effekten unter Freilandbedingungen als ziemlich gering angesehen werden kann (Alves *et al.* 1998). Der direkte Vergleich der Ergebnisse mit Ergebnissen anderer Studien ist schwierig, da die Wirkung der Schädlingsbekämpfungsmittel durch verschiedene Faktoren erheblich beeinflusst werden kann. Einen Einfluss auf die Ergebnisse haben u. a. die Wahl des Pilzstammes (variierende Sensitivität), die Verwendung unterschiedlicher Formulierungen und Konzentrationen der Schädlingsbekämpfungsmittel, die unterschiedlichen Methoden sowie unterschiedliche externe Bedingungen (Alves *et al.* 1998, Anderson und Roberts 1983).

1.4.1 Dimethylsulfoxid

Kommerzielle Pflanzenschutzmittel enthalten verschiedene Adjuvanzen zur Formulierung der Wirkstoffe, die selbst einen erheblichen Einfluss auf die Wirkung haben können (Tamai *et al.* 2002, Anderson und Roberts 1983). Um derartige Effekte auszuschalten, wurden in den vorliegenden Untersuchungen reine Wirkstoffe verwendet. Allerdings mussten die lipophilen Wirkstoffe dabei mit einem Lösungsvermittler in Lösung gebracht werden. Für die vorliegenden Versuche wurde Dimethylsulfoxid als Lösungsmittel verwendet, da es ein amphipathisches Molekül mit einer polaren und zwei unpolaren Gruppen ist, wodurch es nicht nur in wässrigen, sondern auch in organischen, Flüssigkeiten löslich ist und zusätzlich ein gutes Lösungsmittel für in Wasser unlösliche Stoffe darstellt (Santos *et al.* 2003). Des Weiteren wird es auch für die Kryokonservierung entomopathogener Pilze (in Konzentrationen von 5 %) benutzt (Nakasone *et al.* 2004). Da aber auch cytotoxische Effekte von DMSO bekannt sind (z. B. Hanslick *et al.* 2009, da Violante *et al.* 2002), war es also fraglich, wie die beiden Stämme von *M. anisopliae* auf DMSO reagierten. Die Benutzung von

DMSO bei 25 °C hatte keine positiven Effekte auf MA-K und MA-7. Es konnte nur die geringste getestete Konzentration von 1 % benutzt werden, ohne dass negative Effekte auftraten. Es muss in diesem Fall davon ausgegangen werden, dass die Konzentration von 5 % bei der Kryokonservierung aufgrund von cytotoxischen Effekten bei 25 °C nicht angewendet werden kann. Die toxischen Effekte sind möglicherweise den hydrophoben Wechselwirkungen bei höheren Temperaturen geschuldet (Arakawa *et al.* 1990).

In der Kombination von 1 % DMSO und 40 oder 200 ppm Fipronil bzw. 20 oder 100 ppm Etoxazol traten des Weiteren negative Effekte gegenüber MA-7 auf, wenn die Ergebnisse mit MA-7-Kolonien verglichen wurden, die auf dem Kontrollmedium ohne DMSO wuchsen. Dies ist verwunderlich, da es keine signifikant negativen Effekte auf MA-7 gab, wenn die Fipronil- oder Etoxazol-Konzentrationen in Kombination mit 1 % DMSO mit einer 1 % DMSO-Kontrolle verglichen wurden. Außerdem hatte 1 % DMSO allein keine negativen Effekte auf MA-7. Möglicherweise sind bereits bei der Anwendung von 1 % DMSO nicht messbare Effekte aufgetreten, die sich mit den negativen Effekten der höheren Konzentrationen von Fipronil und Etoxazol addieren, so dass gegenüber einer Kontrolle ohne DMSO signifikante Effekte sichtbar werden.

1.4.2 NeemAzal

Fungizide Effekte von verschiedenen Neemprodukten (Öle, Presskuchen und Blattextrakte) sind für verschiedene Pflanzenpathogene beschrieben (Locke 2002). Hirose *et al.* (2001) sowie Aguda *et al.* (1986) beobachteten eine Beeinträchtigung von der Keimung, dem Wachstum und der Sporulation von *M. anisopliae* und *Beauveria bassiana* durch Neemöl. Das in den hier vorliegenden Versuchen benutzte NeemAzal, mit dem aktiven Inhaltsstoff Azadirachtin A, hatte keinen Effekt auf die Keimung beider *M. anisopliae*-Stämme und das vegetative Wachstum von MA-K wurde nur in der höchsten Dosis leicht negativ beeinflusst. MA-7 hingegen wurde stärker beeinträchtigt. Obwohl das vegetative Wachstum von keiner NeemAzal-Konzentration um mehr als 5 % gegenüber der Kontrolle reduziert wurde, wurde die Sporulation um bis zu 33 % vermindert. Dennoch indizieren die T-Werte eine Kompatibilität beider Pilzstämme mit allen getesteten NeemAzal-Konzentrationen. Die Unterschiede dieser Ergebnisse zu Ergebnissen anderer Studien mögen durch die unterschiedlichen Formulierungen der verschiedenen Neemprodukte und durch die variierenden Mengen der aktiven Substanzen begünstigt sein (Hirose *et al.* 2001). Generell ist ein Vergleich von Versuchen mit nicht standardisierten biologischen Produkten schwierig (Locke 2002).

1.4.3 Permethrin

Mit der Wirkstoffgruppe der Pyrethroide wurden bereits zahlreiche Studien durchgeführt und es wurden dabei unterschiedliche Effekte auf entomopathogene Pilze gefunden. Pyrethroide können sowohl inhibitorisch auf diese Pilze wirken (de Oliveira und Neves 2004, Duarte *et al.* 1992) als auch keinen Effekt haben (Mochi *et al.* 2005, Loureiro *et al.* 2002, Pachamuthu und Kamble 2000, Clark *et al.* 1982). Die Anzahl der koloniebildenden Einheiten wurde von Anderson und Roberts (1983) für *B. bassiana* unter dem Einfluss von 959 ppm Permethrin untersucht. Dabei fanden sie eine 20 % Hemmung. Clark *et al.* (1982) konnten andererseits keinen Einfluss auf das Myzeltrockengewicht von *B. bassiana* durch die empfohlene Dosis von 0,11 kg/ha Permethrin (entspricht ungefähr 120 ppm unter der Annahme, dass 900 bis 1000 l Wasser/ha für die Kartoffelkultur verwendet werden) finden. Auf *M. anisopliae* hatte Permethrin ebenfalls keinen hemmenden Effekt (Mohamed *et al.* 1987). Auch keine der getesteten Konzentrationen in den vorliegenden Experimenten hatte einen negativen Einfluss auf die Pilzstämmen. Die niedrigste Konzentration hatte im Gegenteil sogar einen förderlichen Effekt auf die Anzahl der produzierten Konidien von MA-7. Ähnliche Beobachtungen machten Lecuona *et al.* (2001) für *B. bassiana* bei Anwendung von Deltamethrin. In ihren Versuchen steigerten Konzentrationen, die zwischen 10 % und 200 % der empfohlenen Konzentration von 25 mg/m² lagen, die Anzahl der koloniebildenden Einheiten von *B. bassiana* im Vergleich zur Kontrolle. Auch wurden bereits erste Kombinationsversuche von *M. anisopliae* mit Permethrin in Konzentrationen von 0,025; 0,05 und 0,25 ppm gegen Nymphen von *Ixodes scapularis* durchgeführt und dabei additive Effekte zwischen Pilz und Schädlingsbekämpfungsmittel gefunden (Hornbostel *et al.* 2005).

1.4.4 Imidacloprid

Einige Studien konnten eine Steigerung der Virulenz von *M. anisopliae* durch Imidacloprid zeigen, was für eine Kompatibilität des Stoffes mit dem Pilz spricht (Jaramillo *et al.* 2005, Moino Jr. und Alves 1998, Quintela und McCoy 1998b). Von Batista Filho *et al.* (2001) wurde Imidacloprid jedoch als moderat toxisch gegenüber *M. anisopliae* in der höchsten empfohlenen Konzentration von 400 g/ha und als inkompatibel (sehr toxisch) in der minimalen Konzentration von 70 g/ha eingestuft. Ein Vergleich der vorliegenden Daten mit denen dieser Autoren ist schwierig, da Batista Filho *et al.* (2001) die getesteten Konzentrationen nicht exakt angegeben haben. Bei einem angenommenen Wassereinsatz von 100 l/ha, wie ihn die Autoren für ein Freilandexperiment angegeben haben, würden die Konzentrationen bei circa 700 und 4000 ppm liegen, was deutlich über den in den

vorliegenden Versuchen getesteten Konzentrationen liegt. Moino Jr. und Alves (1998) stuften wiederum die von ihnen getesteten Imidacloprid-Konzentrationen (9,9 mg/100 ml [~ 99 ppm] und 33,3 mg/100 ml [~ 333 ppm]) als kompatibel mit *M. anisopliae* ein. Neves *et al.* (2001) konnten keine Hemmung der Keimung, des Wachstums oder der Sporulation von *M. anisopliae* durch die getesteten Imidacloprid-Konzentrationen von 210 ppm, 300 ppm (30 g/100 l) oder 390 ppm (Confidor 700 WDG) finden. Auch Lourerio *et al.* (2002), die den Effekt der empfohlenen Dosis von Confidor Gr (300 g/100 l entspricht circa 3000 ppm) auf das vegetative Wachstum und die Sporulation von *M. anisopliae* untersuchten, fanden nur eine leichte Reduktion der Sporulation und stuften Confidor Gr als kompatibel ein. Diese Ergebnisse stimmen alle mit den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen überein. Es wurde sogar ein verbessertes vegetatives Wachstum von MA-7 durch Konzentrationen, die höher als 0,32 ppm Imidacloprid waren, erzielt. Warum Imidacloprid, aber auch andere Schädlingsbekämpfungsmittel, die Vitalität von entomopathogenen Pilzen steigern können, ist bislang nicht bekannt. Eine von Moino Jr. und Alves (1998) in Betracht gezogene Erklärung ist, dass das erhöhte Wachstum und die erhöhte Konidienbildung zur Kompensation der toxisch werdenden Umwelt dienen.

1.4.5 Kombination von Permethrin und Imidacloprid

Es scheint, dass Imidacloprid in der Kombination mit Permethrin, wie auch als alleinige Komponente, keinen negativen Effekt auf die Pilze hatte, wohingegen Permethrin das Wachstum von MA-K verringerte. Die Keimung und die Sporenbildung wurden durch die Kombination von Permethrin und Imidacloprid negativ beeinflusst. Dies ist überraschend, da die Komponenten einzeln keinen negativen, sondern einen eher positiven Einfluss auf die beiden Pilzstämme hatten. Eine Erklärung für diese Ergebnisse kann nicht mit Bestimmtheit geliefert werden. Möglich ist aber, dass in der Einzelanwendung der beiden Stoffe nicht messbare Effekte aufgetreten sind, die sich erst in der Kombination so verstärkt haben, dass sie einen messbaren Einfluss auf die Virulenzparameter hatten.

1.4.6 Fipronil

Über den Einfluss von Fipronil auf entomopathogene Pilze sind bislang nur wenige Informationen verfügbar. Moino Jr. und Alves (1998) haben den Effekt zweier Konzentrationen von Fipronil (83,3 mg/100 ml ~ 833 ppm und 24,9 mg/100 ml ~ 249 ppm) auf *M. anisopliae* und *B. bassiana* untersucht und einen leichten Rückgang der Keimung, des Wachstums und der Sporulation mit zunehmender Fipronil-Konzentration im Vergleich zur

Kontrolle gefunden. Dennoch wurden beide Konzentrationen, die mit Hilfe des auch in dieser Untersuchung verwendeten Toxizitätsschemas bewertet wurden, als kompatibel eingestuft. Die T-Werte, die für MA-K und MA-7 berechnet wurden, lagen unter denen, die Moino Jr. und Alves (1998) für ihre Stämme ermittelt hatten, obwohl die angewendeten Konzentrationen in der vorliegenden Studie niedriger waren. Batista Filho *et al.* (2001), die Wachstum und Konidienanzahl untersuchten, stuften Fipronil in der geringeren Konzentration (15 g/ha ~ 150 ppm) als moderat toxisch und in der höheren Dosierung (250 g/ha ~ 2500 ppm) als sehr toxisch für *M. anisopliae* ein.

Die Keimung ist ein wichtiger Parameter, der die Lebensfähigkeit des Pilzes zum Beginn des Virulenzprozesses bestimmt (da Silva und Neves 2005). Da diese nur leicht negativ von Konzentrationen über 1,6 ppm beeinflusst wurde und die T-Werte für die niedrigsten Konzentrationen eine Kompatibilität ergaben, kann davon ausgegangen werden, dass Fipronil zumindest in diesen niedrigen Dosierungen mit MA-K und MA-7 kombiniert werden kann, ohne dass negative Auswirkungen auf die Effektivität zu erwarten sind.

1.4.7 Amitraz

Nach derzeitigem Kenntnisstand ist Amitraz bisher nicht an *M. anisopliae* getestet worden. Amitraz hatte auf Keimung, vegetatives Wachstum und Sporenbildung von *B. bassiana* einen negativen Einfluss (Alizadeh *et al.* 2007, de Oliveira und Neves 2004). Die getesteten Konzentrationen von de Oliveira und Neves (2004) überstiegen die Konzentrationen aus diesem Versuch allerdings um mindestens das 4,5-fache. Die höheren Konzentrationen von Amitraz in den vorliegenden Versuchen hatten ebenfalls einen negativen Einfluss, jedoch wurde in geringeren Konzentrationen volle Kompatibilität erreicht. Es konnte eine steile Dosis-Wirkungs-Kurve für Amitraz gegenüber den Pilzen ermittelt werden, so dass Hemmungen relativ einfach durch Auswahl einer geeigneten Konzentration kontrolliert werden können.

1.4.8 Etoxazol

Etoxazol wurde bislang ebenfalls nicht für Kompatibilitätsstudien an entomopathogenen Pilzen genutzt. Aufgrund der Eigenschaft die Chitinsynthese zu inhibieren (Nauen und Smagghe 2006, Suzuki *et al.* 2001), wurde davon ausgegangen, dass es auch bei Pilzen den Zellwandaufbau hemmt. Etoxazol wurde in geringeren Konzentrationen (0,032 bis 100 ppm) als die anderen Schädlingsbekämpfungsmittel getestet, da es bei vollgesogenen Nymphen von *Amblyomma hebraeum* bereits in sehr geringer Konzentration wirkte. Benzoyl-

phenylharnstoff-Insektizide, die einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Etoxazol haben sollen (Nauen und Smagghe 2006), beeinflussten entomopathogene Pilze in anderen Kombinationsversuchen tendenziell negativ. Diflubenzuron (9586 ppm) verringerte die Anzahl der koloniebildenden Einheiten von *B. bassiana* (Anderson und Roberts 1983). Alizadeh *et al.* (2007) fanden eine nahezu komplette Hemmung der Keimung, des vegetativen Wachstums und der Sporenbildung von *B. bassiana* durch 25 ppm Flufenoxuron. *M. anisopliae* (ACMA-5) wurde durch Chlorfluazuron und Teflubenzuron in Konzentrationen bis 250 ppm nicht oder nur leicht im vegetativen Wachstum eingeschränkt, während Flufenoxuron bereits ab 30 ppm eine leichte Hemmung des Wachstums verursachte (Hiromori und Nishigaki 1998).

Es gab eine deutliche Beeinträchtigung des Wachstums und der Sporenbildung durch die beiden höheren Konzentrationen von Etoxazol. Dennoch konnten alle Konzentrationen mit MA-K als kompatibel eingestuft werden. Für MA-7 hingegen waren die beiden höchsten Konzentrationen (mit 1 % DMSO) moderat toxisch bzw. toxisch. Die Anwendung von geringen Etoxazol-Konzentrationen (< 4 ppm) ist aber laut Toxizitätsschema von Alves *et al.* (1998) möglich.

1.4.9 Fazit

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass keines der getesteten Schädlingsbekämpfungsmittel die Entwicklung der getesteten Pilzstämme MA-K und MA-7 und damit die Pathogenität für einen Wirt, bei kombinierter Anwendung in ausgesuchten Konzentrationen stören sollte, da die Hemmung der Keimung maximal bei 15 % lag und die meisten Schädlingsbekämpfungsmittel zumindest in geringen Konzentrationen keinen negativen Einfluss auf die Keimung hatten. Selbst die höchsten Konzentrationen der Schädlingsbekämpfungsmittel (außer bei Fipronil) führten zu keiner Reduktion der Koloniegröße um mehr als 13 % im Vergleich zur Kontrolle. Nur die Konidienbildung wurde teilweise stark negativ beeinflusst. Klassifiziert man die Schädlingsbekämpfungsmittel und ihre Konzentrationen jedoch mit Hilfe des Toxizitätsschemas von Alves *et al.* (1998), sind nur Fipronil und Etoxazol in den jeweils höchsten Konzentrationen nicht mit MA-7 kompatibel. Folglich ist es möglich NeemAzal, Permethrin, Imidacloprid, Fipronil, Amitraz und Etoxazol in geringen Konzentrationen gelöst in 1 % DMSO mit beiden Stämmen von *M. anisopliae* in Kombinationsversuchen mit Zecken anzuwenden.

Kapitel 2: Wirkung von *Metarhizium anisopliae* in Kombination mit Fipronil oder Etoxazol auf vollgesogene Nymphen und ungesogene Adulte von *Amblyomma hebraeum*

Zusammenfassung

Amblyomma hebraeum ist eine dreiwirtige Zecke, die warme, moderat humide Savannen im südlichen Teil von Afrika bewohnt. Aufgrund der teils gravierenden Stichwunden, die Sekundärinfektionen zur Folge haben können, und der Übertragung von veterinär- und humanmedizinisch bedeutenden Pathogenen, ist eine Kontrolle erforderlich. Diese geschieht meist über chemische Ektoparasitizide. Aufgrund von toxikologischen Bedenken, Effekten auf Nicht-Zielorganismen, Resistenzentwicklungen und der Kosten, die eine Behandlung verursacht, wäre es wünschenswert, ein wirksames biologisches Präparat mit geringen ökologischen Nebenwirkungen nutzen zu können. Entomopathogene Pilze (u. a. *Metarhizium anisopliae*) sind in dieser Hinsicht vielversprechende Organismen für eine biologische Schädlingsbekämpfung, da sie einfach in größeren Mengen herzustellen sind und wie herkömmliche Schädlingsbekämpfungsmittel angewendet werden können. Außerdem haben sie ein sekundäres Verbreitungspotenzial (Potenzial zu Epizootien) und sind relativ sicher für die Umwelt. Allerdings variiert die Wirksamkeit der entomopathogenen Pilze in Abhängigkeit von Umweltbedingungen und anderen Faktoren stark. Eine Möglichkeit ihre Wirksamkeit zu erhöhen, ist der Einsatz einer Kombination aus entomopathogenen Pilzen und niedrig dosierten Schädlingsbekämpfungsmitteln. Durch die Schädlingsbekämpfungsmittel könnte über Verhaltensänderungen der Zielorganismen ein verstärkter Kontakt mit den infizierenden Sporen hervorgerufen oder die Immunantwort der Zielorganismen durch Stress herabgesetzt werden.

In der vorliegenden Studie wurde die Empfindlichkeit vollgesogener Nymphen und ungesogener Adulte von *A. hebraeum* auf Fipronil und Etoxazol, die Pilzstämme MA-K und MA-7 sowie ihre Kombinationen in *in vitro* Versuchen untersucht. Zunächst wurden die subletalen Fipronil- und Etoxazol-Konzentrationen und die Konzentrationen mit geringem Wirkungsgrad der beiden *M. anisopliae*-Stämme mittels einer Tauchmethode untersucht. Die ermittelten Konzentrationen wurden im nächsten Schritt kombiniert angewendet. Die Mortalität wurde dabei zweimal pro Woche bis zum Schlupf der Adulten bzw. bei Adulten über 28 Tage bestimmt.

Die Kombinationen aus *M. anisopliae* und Etoxazol führten abhängig von der Etoxazol-Konzentration zu unterschiedlichen Effizienzen gegenüber vollgesogenen Nymphen. Die

Effekte der Kombinationen aus *M. anisopliae* und der höheren Etoxazol-Konzentration (0,032 ppm) wurden als antagonistisch eingestuft, während die Kombinationen mit 0,0064 ppm als additiv eingestuft werden konnten. Die Kombinationen mit Fipronil erzielten keine höheren Mortalitäten der Nymphen als die Einzelbehandlungen. Nur die Kombination aus $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml MA-7 und 1,6 ppm Fipronil war additiv. Es konnte sowohl für die Männchen als auch für die Weibchen eine erhöhte Mortalität in den meisten Kombinationsansätzen aus *M. anisopliae* und Fipronil gegenüber den Einzelbehandlungen beobachtet werden. Die gefundenen Effekte ließen sich als additiv und synergistisch einstufen. Eine kombinierte Anwendung von *M. anisopliae* und Fipronil gegen *A. hebraeum* ist also möglich und potenziell in der Lage, die Wirksamkeit des Pilzes zu erhöhen. Allerdings sollten weitere Studien zur Stabilisierung der Wirkungssicherheit durchgeführt werden. Eine kombinierte Anwendung von Etoxazol mit niedrigen Konzentrationen von *M. anisopliae* scheint nur eingeschränkt erfolgsversprechend.

Keywords: *Amblyomma hebraeum*, *Metarhizium anisopliae*, niedrig dosierte Schädlingsbekämpfungsmittel, synergistische Effekte, biologische Zeckenkontrolle

2.1 Einleitung

Die Gattung *Amblyomma* gehört zu den Schildzecken (Ixodidae) und umfasst mit mittelgroßen bis großen Adulten die größten Zeckenarten der Ixodidae (Sonenshine 1991). *Amblyomma hebraeum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae), auch „bont tick“ (~ „buntscheckige Zecke“), ist eine dreiwirtige Zecke, die warme, moderate humide Savannen im südlichen Teil von Afrika bewohnt (Khan 2010). Larven und Nymphen saugen an verschiedenen kleinen Säugetieren und an am Boden fressenden Vögeln (Nicholson *et al.* 2009). Adulte befallen Vieh und Wildtiere und suchen sich zum Blutsaugen bevorzugt relativ unbehaarte Stellen aus (Khan 2010). Die mit circa einem Drittel der Körperlänge relativ langen Mundwerkzeuge der Adulten erschweren es, festgesogene Zecken zu entfernen (Khan 2010, Lounsbury 1899). Häufig entstehen durch den Stich gravierende Wunden, die von Bakterien oder von Schraubenwurmfiegen (z. B. *Chrysomya bezziana*) sekundär befallen werden können (Khan 2010). *A. hebraeum* überträgt *Ehrlichia ruminantium* (Erreger der Herzwasserkrankheit bei Wiederkäuern), welche im südlichen Afrika ein großes Problem darstellt (Norval 1977a). Außerdem übertragen die Zecken *Rickettsia africae*, den Auslöser des südafrikanischen Zeckenfiebers beim Menschen (Khan 2010).

Die Adulten haben eine eiförmige Gestalt und erreichen ungesogen eine Länge von 4,2 mm bis 6,3 mm und eine Breite von 3,5 mm bis 4,9 mm (Arthur 1962, Lounsbury 1899). Die Schilder, die bei Männchen den ganzen Rücken, bei Weibchen aber nur einen kleinen Teil bedecken, sind mit hellen, glitzernden Farben versehen. Zusätzlich werden durch schwarze Linien Muster hervorgerufen (Lounsbury 1899). Die Weibchen haben eine schwarze Färbung, die sich vollgesogen zu rotbraun verändert. Vollgesogen erreichen sie eine Länge von etwa 25 mm, eine Breite von 19 mm und eine Höhe von 13 mm (Lounsbury 1899). Männchen hingegen sind vollgesogen kaum größer als ungesogen (Lounsbury 1899). Weibchen saugen sechs bis zwölf Tage (Nutall 1915) am Wirt, wobei sie bis zur Befruchtung nur die Hälfte des Blutes und erst danach die restliche Blutmahlzeit zu sich nehmen (Arthur 1962). Ein Weibchen kann über einen Zeitraum von drei bis neun Wochen zwischen 10.000 und 20.000 Eier ablegen (Arthur 1962, Nutall 1915, Lounsbury 1899). Nymphen verbleiben zwischen 5 und 22 Tagen am Wirt (Arthur 1962, Nutall 1915). Die Entwicklung zu Adulten beträgt anschließend 18 bis 21 Tage bei 30 °C (Nutall 1915), kann sich aber auch über 8 bis 14 Wochen hinziehen (Arthur 1962, Lounsbury 1899). Der Lebenszyklus kann im Labor innerhalb von fünf bis acht Monaten (bei circa 30 °C) vollendet werden (Nutall 1915), die Dauer nimmt aber mit abnehmender Temperatur exponentiell zu (circa 25 Monate bei 15 °C) (Norval 1977b). Im Freiland kann sich die Dauer des Lebenszyklus, u. a. aufgrund der

schwankenden Temperaturen, erheblich unterscheiden (Nutall 1915) und wird auf 9 bis mehr als 24 Monate geschätzt (Lounsbury 1899). Die Entwicklungsdauer ist immer auch von der Wirtsfindung abhängig (Mehlhorn und Piekarski 2002). Ohne Wirt können Adulte 15 – 22 Monate, Nymphen und Larven zwischen einem Monat und zwölf Monaten überleben (Arthur 1962, Nutall 1915). *A. hebraeum* gehört zu den wenigen Arten, deren Nymphen und Adulte aktiv nach einem geeigneten Wirt suchen (Eckert *et al.* 2008, Sonenshine 1993). Ungesogene Zecken bevorzugen dabei bereits befallene Wirte, die sie über ein von den Männchen produziertes Aggregations-Anheftungs-Pheromon (im Englischen „aggregation-attachment pheromone“) finden. Dieses Pheromon hat anscheinend die Funktion das Anheften an einen unpassenden Wirt (z. B. ein Tier mit gutem Putzverhalten) zu verhindern. Auf dem Wirt führt es dazu, dass sich die Geschlechter zusammenfinden und stellt sicher, dass die Zecken sich an einer zum Blutsaugen günstigen Stelle anheften, die der Wirt schlecht putzen kann (Norval *et al.* 1989). Da *A. hebraeum* ein breites Wirtsspektrum hat (Norval *et al.* 1994) ist eine Ausrottung dieser Zeckenart schwierig. Diese ist nur in Gebieten möglich, in denen keine alternativen Wirtstiere vorkommen. Es gibt zwar einige Rinderarten (z. B. Sangas und Zebus), die eine hohe Resistenz gegen Zecken aufweisen und damit auch seltener an den von Zecken übertragenen Krankheiten erkranken (Norval *et al.* 1994, Rechav *et al.* 1991); es gibt aber Tendenzen, dass die Haltung von anfälligeren Mischrassen zunimmt (Ocaido *et al.* 2009). Viele Farmer halten die von der Regierung bereitgestellten Ektoparasitizidtauchbäder für ineffektiv und greifen zum Teil auf andere kommerzielle Ektoparasitizide, vor allem aber auf alternative Bekämpfungsstrategien zurück (u. a. Desinfektionsmittel, Motoröl, Pflanzenextrakte, Hühner, manuelles Entfernen), da die Anwendung von chemischen Ektoparasitiziden für Farmer mit begrenzten Mitteln zu teuer ist (Moyo und Masika 2009). Durch die geringe Effizienz dieser Methoden ist meist keine ausreichende Kontrolle der Zecken und der von ihnen übertragenen Krankheiten möglich (Mtshali *et al.* 2004). Aufgrund der Nachteile von chemischen Schädlingsbekämpfungsmitteln, u. a. toxikologische Bedenken, Effekte auf Nicht-Zielorganismen, Resistenzen und Kosten (Castro-Janer *et al.* 2010, Moyo und Masika 2009, Schulze *et al.* 2005, Gassner *et al.* 1997), sollte nach biologischen Alternativen gesucht werden. Eine Alternative könnten entomopathogene Pilze wegen ihrer vorteilhaften Eigenschaften sein, u. a. ihrer einfachen Herstellung, der Ektoparasitizid ähnlichen Applikation (Wraight *et al.* 2007, Roberts und St. Leger 2004), des direkten Eindringens in den Wirt (Samish und Rehacek 1999), ihres sekundären Verbreitungspotenzials (Thomas *et al.* 1995, Kaaya und Okech 1990) und der geringen Belastung für Nicht-Zielorganismen (z. B. Zimmermann 2007, Roberts und St. Leger 2004).

Über die Wirksamkeit entomopathogener Pilze gegenüber *A. hebraeum* gibt es bislang keine Studien. Larven, Nymphen und Adulte von anderen *Amblyomma*-Arten sind zum Teil sehr empfindlich gegenüber entomopathogenen Pilzen, u. a. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 (Hypocreales: Clavicipitaceae) (Kirkland *et al.* 2004a, Kaaya und Hassan 2000, Souza *et al.* 1999). Ein Problem stellt allerdings die starke Variabilität der Virulenz (z. B. Kirkland *et al.* 2004b, Gindin *et al.* 2002) und der relativ langsame Tötungsprozess dar (Alves 1998). Dieses kann unter Umständen mit zusätzlicher Applikation niedriger Konzentrationen natürlicher oder synthetischer Schädlingsbekämpfungsmittel verbessert werden (Hiromori und Nishigaki 2001, Quintela und McCoy 1998b, Anderson *et al.* 1989). Dabei sollte die Nutzung niedrig dosierter Schädlingsbekämpfungsmittel das Risiko einer Belastung der Umwelt und unerwünschter Nebenwirkungen auf Nicht-Zielorganismen gering halten. Als mögliche Kandidaten für eine Kombination wurde zum einen Etoxazol ausgewählt, da es eine geringe Säugertoxizität hat, in der Umwelt schnell abgebaut wird (Dekeyser 2005) und in Versuchen an Zecken ein Potenzial als Zeckenbekämpfungsmittel zeigte (Tamura *et al.* 2004). Es kann allerdings nur die Entwicklung zum nächsten Entwicklungsstadium unterbunden werden. Deshalb kommt es nur bei vollgesogenen Larven und Nymphen zur Anwendung, da der Wirkmechanismus von Etoxazol in der Hemmung des Häutungsprozesses (Suzuki *et al.* 2001), genauer, laut Nauen und Smagge (2006), in der Hemmung der Chitin-Biosynthese, vermutet wird. Als zweiter Stoff, der auch bei ungesogenen Zecken Anwendung findet, wurde Fipronil ausgewählt, da es eine schnelle Kontakt- und eine langanhaltende Residualwirkung hat (Blagburn und Lindsay 2001, Wiedemann 2000, Postal *et al.* 1995) und für Vertebraten weitestgehend ungefährlich ist (Ungemach 2010, Kunkle 1997). Vor der Kombination mit den *M. anisopliae*-Stämmen wurden beide Stoffe auf Kompatibilität mit den Stämmen getestet (siehe Kapitel 1). Als zu behandelndes Entwicklungsstadium der Zecken wurden gesogene Nymphen gewählt und zusätzlich wurden erste Tests mit ungesogenen Adulten durchgeführt. Zunächst wurden von Fipronil, Etoxazol und beiden *M. anisopliae*-Stämmen subletale Konzentrationen ermittelt. Die so ermittelten Konzentrationen wurden dann in einem nächsten Schritt in Kombinationen getestet.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Handhabung der Zecken

Die vollgesogenen Nymphen von *A. hebraeum* wurden von der Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen geliefert. Gefüttert wurden die ungesogenen Nymphen circa zwei Wochen nach

ihrer Häutung zu Nymphen an Rindern. Für die Fütterung wurde ein Baumwollbeutel mit (hautfreundlichem) Klebstoff auf dem Rinderrücken befestigt, in den die ungesogenen Nymphen überführt wurden. Nach Entnahme der abgefallenen, vollgesogenen Nymphen aus dem Beutel wurden diese versendet und kamen ein bis zwei Tage später am Versuchsort an. Sie wurden entweder sofort getestet oder, wenn dies nicht möglich war, bei 14 °C aufbewahrt und spätestens zwei Tage nach Erhalt getestet. Am Versuchstag wurde gewartet bis die Zecken auf Zimmertemperatur erwärmt waren.

Ein Teil der vollgesogenen Nymphen wurde bei 23 ± 2 °C und 75 % relativer Luftfeuchte gehalten bis nach vier bis sechs Wochen die Adulten schlüpften. Die ungesogenen Adulten wurden nach Geschlecht aufgeteilt und circa zwei Wochen nach ihrem Schlupf getestet. Bis zum Versuch wurden die Zecken bei 14°C aufbewahrt. Am Versuchstag wurde gewartet bis die Adulten auf Zimmertemperatur erwärmt waren.

2.2.2 Ermittlung der subletalen Konzentrationen von Etoxazol und Fipronil

Die getesteten Präparate Fipronil (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und Etoxazol (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg) lagen als Reinstoffe in Pulverform vor. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften wurde die höchste Fipronil-Konzentration (1000 ppm) und die höchste Etoxazol-Konzentration (100 ppm) mit 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) in eine wässrige Lösung gebracht. Der DMSO-Anteil in den übrigen Fipronil- bzw. Etoxazol-Ansätzen nahm jeweils um den Faktor fünf ab. Zur Ermittlung der subletalen Konzentrationen von Fipronil und Etoxazol für vollgesogene Nymphen bzw. von Fipronil für ungesogene Adulte wurden die Tiere mittels einer Tauchmethode behandelt. Es wurden 16 ml mit jeweils sieben Konzentrationen von Fipronil (0,064 bis 1000 ppm) und Etoxazol (0,0064 bis 100 ppm) getestet. Als Kontrolle diente 5 % DMSO. Die Versuche mit den Schädlingsbekämpfungsmitteln wurden für Nymphen dreimal mit je 25 Tieren pro Testsubstanz wiederholt. Für die Adulten wurde ein Versuch mit 29 Weibchen und 20 Männchen je Konzentration von Fipronil bzw. der Kontrolle durchgeführt.

2.2.3 Ermittlung der konzentrationsabhängigen Wirkungsgrade von MA-K und MA-7

Es wurden die Stämme MA-K und MA-7 (Volcani Center, Bet Dagan, Israel) verwendet. Beide Stämme wurden zwei bis drei Wochen lang auf Kartoffel-Dextrose-Agar (39,5 g/l), der mit Hefeextrakt (5 g/l) und Pepton (5 g/l) angereichert war, in einer Klimakammer bei 25 ± 1 °C und einer Licht-Dunkel-Periode von 16 Stunden zu 8 Stunden angezogen. Die Konidien wurden abgeerntet und in sterilem *Aq. dest.*, das mit 0,05 % Tween[®]80 (Carl Roth

GmbH + Co. KG, Karlsruhe) versetzt war, suspendiert. Um zu untersuchen, ob es in Kombinationen mit den Schädlingsbekämpfungsmitteln zu einer Wirkungsstabilisierung oder sogar -steigerung der *M. anisopliae*-Stämme kommt, muss mit Konzentrationen ($\sim LC_{50}$) gearbeitet werden, bei denen es möglich ist, einen Effekt der Schädlingsbekämpfungsmittel festzustellen. Zur Bestimmung dieser Konzentrationen mit geringem Wirkungsgrad wurde 15 ml einer Konidien-Konzentration ($1,0 \times 10^1$ bis $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml) mittels der Tauchmethode verwendet. Steriles *Aq. dest.*, das mit 0,05 % Tween80 versetzt wurde, wurde als Kontrolle benutzt. Die Pilzkonzentrationstests wurden für Nymphen dreimal mit je 20 Tieren je Testsubstanz wiederholt. Für die Adulten wurde ein Versuch mit 20 Weibchen und 15 Männchen je Konzentration der *M. anisopliae*-Stämme bzw. Kontrolle durchgeführt.

2.2.4 Versuche mit den Kombinationen aus *M. anisopliae* und Fipronil/Etoxazol

Die Konzentrationen, die in den vorher beschriebenen Versuchen ermittelt wurden, wurden in einem dritten Schritt kombiniert mit der Tauchmethode angewendet, dabei wurde je Testsubstanz 15 ml zum Tauchen benutzt. Die Kombinationen für die Nymphen enthielten 0,15 ml DMSO, in dem 0,64 oder 3,2 ppm Etoxazol bzw. 32 oder 160 ppm Fipronil gelöst wurden sowie 14,85 ml von $1,01 \times 10^3$ oder $1,01 \times 10^4$ Konidien/ml MA-K bzw. MA-7. Es ergaben sich die folgenden Testkonzentrationen: 0,0064 oder 0,032 ppm Etoxazol mit $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml MA-K bzw. MA-7 sowie 0,32 oder 1,6 ppm Fipronil mit $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml MA-K bzw. MA-7. Für die Adulten wurden die Testsubstanzen wie oben beschrieben angesetzt, für die Versuche wurden aber 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil mit $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von MA-K oder MA-7 genutzt. Die kombinierten Etoxazol-/Fipronil- und MA-K/MA-7-Konzentrationen wurden auch einzeln getestet. Bei allen Versuchen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO als Kontrollen. Für die Nymphen wurden die Fipronil-Kombinationsversuche dreimal und die Etoxazol-Kombinationsversuche viermal mit jeweils 20 Tieren je Testsubstanz wiederholt. Für die Adulten wurden die Kombinationstests zweimal durchgeführt (einmal mit 20 Weibchen und 15 Männchen und das zweite Mal mit jeweils 12 Weibchen und Männchen je Testsubstanz).

2.2.5 Behandlung und Inkubation

Vollgesogene Nymphen bzw. ungesogene Adulte wurden für 60 Sekunden in eine Testsuspension getaucht. Nach dem Abtrocknen wurden die Zecken einzeln auf mit 0,3 ml sterilem *Aq. dest.* angefeuchtetem Filterpapier in Petrischalen gesetzt. Die Petrischalen

wurden mit Parafilm verschlossen, und je 16 Petrischalen wurden auf ein mit 10 ml Wasser angefeuchtetes Tuch in eine Bellaplast-Schale (Rausch Verpackung GmbH, Augsburg) gestellt. Die Schalen wurden mit einem Deckel verschlossen und bei 23 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchte von 75 % im Dunkeln in einer Klimakammer inkubiert.

Die Anzahl der nicht zu Adulten geschlüpften Nymphen wurde 63 Tage nach Behandlung mit den Schädlingsbekämpfungsmitteln bestimmt. Bei den Adulten wurde am Tag 14 nach der Behandlung mit Fipronil die Mortalität bestimmt. Die Mortalität von Nymphen (bis zum Schlupf) und von Adulten (für 28 Tage) wurde bei Versuchen mit Pilzen zweimal die Woche mit Hilfe eines Stereomikroskops kontrolliert. Zusätzlich wurde bei den Nymphen am Ende der Versuche die Rate von den geschlüpften bzw. nicht geschlüpften Adulten bestimmt.

2.2.6 Statistik

Die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven und die Berechnung der LC-Werte wurden mit dem Programm PriProbit Version 1.63 (Sakuma 1996 – 2000) durchgeführt. Neben den LC₅₀- und LC₉₅-Werten wurde auch das 95 % Fiduzialintervall (Toleranzgrenze für die LC-Werte) berechnet. Zusätzlich zu der sigmoiden Kurve wurde die lineare Probitkurve mit dem 95 % Fiduzialintervall und zugehöriger Geradengleichung dargestellt.

Weitere statistische Analysen wurden mit PASW 17 (Predictive Analysis SoftWare) (SPSS Inc.) durchgeführt. Signifikante Unterschiede der einzelnen Konzentrationen zur Kontrolle sowie Unterschiede zwischen Geschlechtern und zwischen den Pilzstämmen wurde mittels χ^2 -Tests bestimmt. Bei allen χ^2 -Tests betrug der Freiheitsgrad eins ($df = 1$). Aufgrund des Versuchsdesigns (jede Zecke wurde einzeln gehalten) war eine Korrektur der Mortalität und somit der direkte Vergleich der *M. anisopliae*-Etoxazol-/Fipronil-Kombinationen mit dem *M. anisopliae* Stamm oder der Etoxazol-/Fipronil-Konzentration nicht möglich. Daher wurden nur die Unterschiede der Varianten zu der jeweiligen Kontrolle überprüft.

Zusätzlich wurde ein Chancenverhältnis (odds-ratio) für jede Variante und ihre Kontrolle berechnet, um so die Wahrscheinlichkeit bestimmen zu können, mit der ein Todesereignis in der Variante oder in der Kontrolle auftreten würde. Ist das Chancenverhältnis dabei gleich eins ($CV = 1$), kann man von einer Homogenität der beiden Gruppen ausgehen. Bei einem Wert größer als eins ($CV > 1$) ist das Auftreten der Mortalität in den Varianten wahrscheinlicher als in der Kontrolle. Bei einem Wert kleiner eins ($CV < 1$) verhält es sich genau umgekehrt (Hatzinger und Nagel 2009, Polasek 2008). Sofern in den Kontrollgruppen keine Mortalität auftrat, wurden die *M. anisopliae*-Etoxazol/Fipronil-Kombinationen direkt auf statistisch signifikante Unterschiede zu *M. anisopliae* und den Schädlings-

bekämpfungsmitteln hin untersucht. Die Nymphenmortalität wurde für einzelne Behandlungen über den Versuchszeitraum mit dem Log-Rang-Test analysiert. Die Dauer bis zum Schlupf in den unterschiedlichen Behandlungen wurde einzeln mit dem U-Test nach Mann und Whitney verglichen. Unterschiede zwischen Nymphen- und Gesamtmortalität wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests ermittelt. Die Unterschiede der Gesamtmortalität wurden für einzelne Behandlungen mit dem χ^2 -Test analysiert. Die Mortalität der Adulten wurde in den unterschiedlichen Behandlungen über den Versuchszeitraum mit dem Log-Rang-Test analysiert. Eine Analyse der Unterschiede in den Mortalitätsverläufen zwischen den Geschlechtern erfolgte mit dem Log-Rang-Test. Das Signifikanzniveau wurde für alle Tests mit $p < 0,05$ angenommen. Die Darstellung signifikanter Unterschiede erfolgte in den Abbildungen mit Sternchen nach folgender Einteilung: $p > 0,05 = \text{n.s.}$ (nicht signifikant), $0,05 > p \geq 0,01 = *$, $0,01 > p \geq 0,001 = **$, $p < 0,001 = ***$.

Für Kombinationen, die eine signifikant unterschiedliche Mortalität zur Tween- und DMSO-Kontrolle aufwiesen, wurde der jeweils vorliegende Effekt (additiv, synergistisch oder antagonistisch) mittels χ^2 -Tests bestimmt (Morales-Rodriguez und Peck 2009, McVay *et al.* 1977). Zunächst wurde die erwartete Mortalität (M_E) der Kombinationen mittels der prozentualen Gesamtmortalität (der Mortalität des letzten Versuchstages), die durch *M. anisopliae* (M_{MA}) und das Schädlingsbekämpfungsmittel (M_{SBM}) allein verursacht wurde, mit folgender Formel berechnet:

$$M_E = M_{MA} + \left(M_{SBM} \times \left(1 - \frac{M_{MA}}{100} \right) \right)$$

Mit der erwarteten Mortalität und der beobachteten Mortalität der Kombinationen (M_{Kombi}) wurde ein $\chi^2_{(E)}$ -Wert berechnet:

$$\chi^2_{(E)} = \frac{(M_{Kombi} - M_E)^2}{M_E}$$

Dieser $\chi^2_{(E)}$ -Wert wurde mit dem χ^2 -Tabellenwert für einen Freiheitsgrad ($df = 1$) und dem 0,95 Quantil ($\chi^2 = 3,84$) verglichen. Ein nicht-additiver Effekt war zu beobachten, wenn der berechnete $\chi^2_{(E)}$ -Wert größer als der Tabellenwert war. Wenn die Differenz aus beobachteter und erwarteter Mortalität der Kombination positiv war, wurde die signifikante Interaktion als synergistisch, wenn sie negativ war als antagonistisch eingestuft (Finney 1947).

2.3 Ergebnisse

2.3.1 Ermittlung der subletalen Konzentrationen von Etoxazol und Fipronil

2.3.1.1 Vollgesogene Nymphen

2.3.1.1.1 Etoxazol

Die Kontrollmortalität lag bei den Dosis-Wirkungs-Versuchen mit Etoxazol bei 18,7 %. Etoxazol hatte einen engen Wirkungsbereich. 0,0064 ppm zeigte keine Wirkung auf die Nymphen ($\chi^2 = 0,36$, $p = 0,55$). Erste Effekte auf die vollgesogenen Nymphen traten aber nach Behandlung mit 0,032 ppm ein ($\chi^2 = 7,33$, $p = 0,007$). Nach Behandlung mit 0,16 ppm oder mehr schlüpfen keine Nymphen mehr zu Adulten ($\chi^2 = 103$, $p < 0,001$) (Abb. 9). Es wurde nach 63 Tagen ein LC_{50} -Wert von 0,037 (0,034 – 0,041) ppm errechnet und ein LC_{95} -Wert von 0,052 (0,047 – 0,057) ppm. Für die Kombinationsversuche wurden die Konzentrationen von 0,0064 ppm und 0,032 ppm ausgewählt.

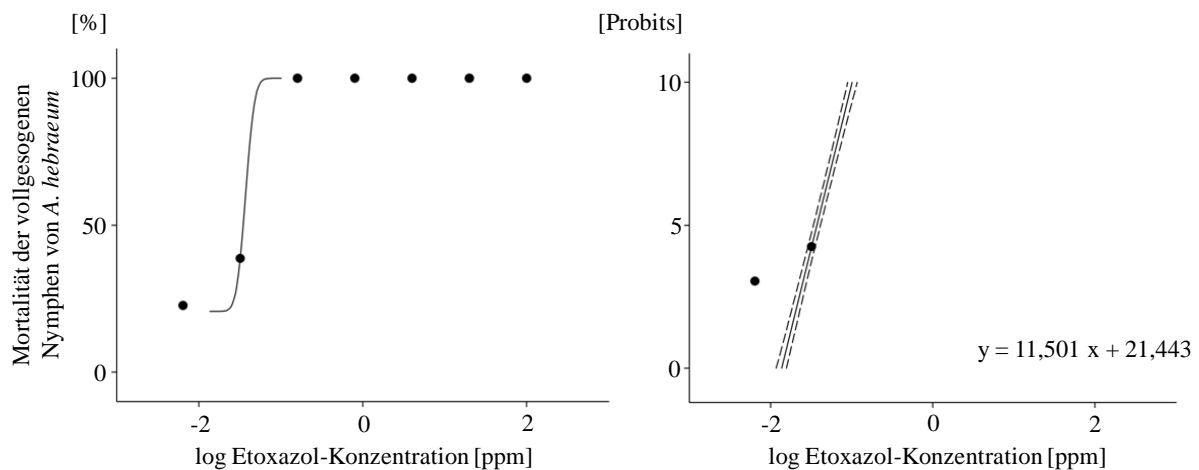


Abb. 9: Anteil der nicht zu Adulten geschlüpften Nymphen von *A. hebraeum* ($n = 75$) in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Etoxazol-Konzentrationen 63 Tage nach der Behandlung. Kurven stellen berechnete Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Prozent oder Probits mit 95 % Fiduzialintervall dar. Als Kontrollsubstanz diente 5 % DMSO. Die Kontrollmortalität lag bei 18,7 % und der LC_{50} -Wert lag bei einer Konzentration von 0,037 (0,034 – 0,041) ppm.

2.3.1.1.2 Fipronil

Die Kontrollmortalität bei der Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Beziehung für Fipronil lag bei den Nymphen bei 12 %. Fipronil-Behandlungen mit 0,064 oder 0,32 ppm hatten keine Wirkung auf die Nymphen ($\chi^2 \leq 2,35$, $p \geq 0,13$). Es starben mehr Nymphen als in der Kontrolle, wenn sie mit 1,6 ppm oder mehr behandelt wurden ($\chi^2 = 19,0$, $p < 0,001$). Um alle Nymphen abzutöten, mussten 1000 ppm aufgewendet werden ($\chi^2 = 118$, $p < 0,001$) (Abb. 10). Fipronil hatte einen deutlich weiteren Wirkungsbereich als Etoxazol. Es errechnete sich nach

63 Tagen ein LC_{50} -Wert von 2,06 (0,26 – 6,36) ppm und ein LC_{95} -Wert von 40,6 (11,8 – 1445) ppm. Für die Kombinationsversuche wurden 0,32 ppm und 1,6 ppm Fipronil ausgewählt.

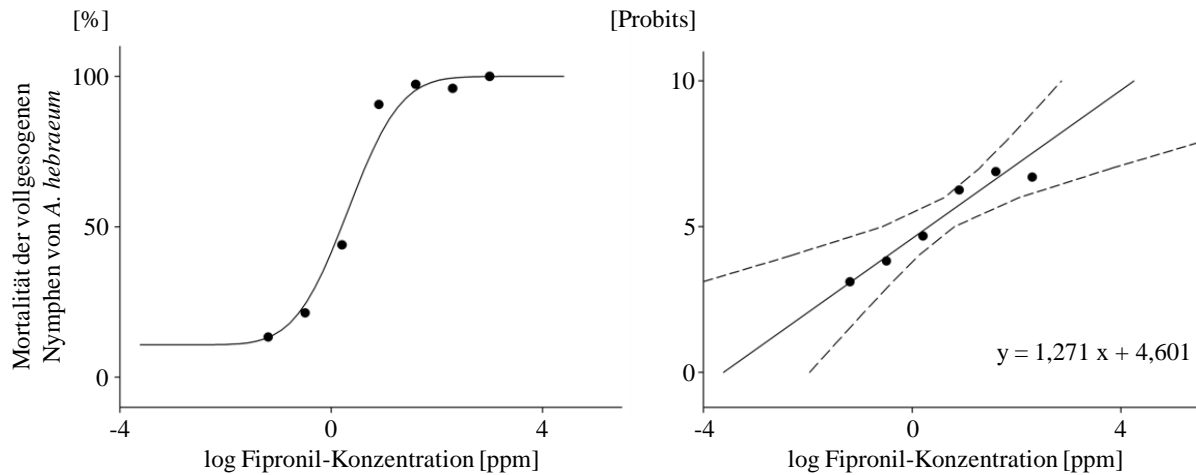


Abb. 10: Anteil der nicht zu Adulten geschlüpften Nymphen von *A. hebraeum* (n = 75) in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Fipronil-Konzentrationen 63 Tage nach der Behandlung. Kurven stellen berechnete Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Prozent oder Probits mit 95 % Fiduzialintervall dar. Als Kontrollsubstanz diente 5 % DMSO. Die Kontrollmortalität lag bei 12 % und der LC_{50} -Wert lag bei einer Konzentration von 2,06 (0,26 – 6,36) ppm.

2.3.1.2 Ungesogene Adulte – Fipronil

Die Adulten waren gegenüber Behandlungen mit mehr als 0,32 ppm Fipronil weniger empfindlich als die Nymphen ($\chi^2 \geq 16,0$, $p < 0,001$). Das Wirkungsspektrum von Fipronil war für beide Geschlechter sehr ähnlich ($\chi^2 \leq 1,08$, $p \geq 0,30$). Für beide Geschlechter lag die natürliche Mortalität bei circa 20 %. Behandlungen mit bis zu 1,6 ppm Fipronil hatten keinen Einfluss auf die Mortalität von Weibchen und Männchen ($\chi^2 \leq 2,5$, $p \geq 0,11$) (Abb. 11). Nach Behandlung mit 8 ppm starben mehr Weibchen und Männchen als in der Kontrolle ($\chi^2 \geq 4,91$, $p \leq 0,03$). Es starben alle Weibchen und Männchen nach Behandlung mit 40 ppm oder mehr ($\chi^2 \geq 21,5$, $p < 0,001$). Daraus errechnete sich ein LC_{50} -Wert (nach 14 Tagen) für die Weibchen von 7,50 (6,40 – 8,86) ppm und ein LC_{95} -Wert von 11,9 (10,0 – 14,7) ppm. Der LC_{50} -Wert für die Männchen lag bei 5,55 (1,17 – 10,0) ppm. Allerdings lag der LC_{95} -Wert bei 28,2 (14,7 – 347,2) ppm. Für die Kombinationsversuche wurden Konzentrationen von 0,064 ppm und 0,32 ppm Fipronil ausgewählt, um sicher zu stellen, dass Fipronil weder MA-K noch MA-7 negativ beeinflusst, was durch höhere Konzentrationen der Fall wäre (siehe Kapitel 1).

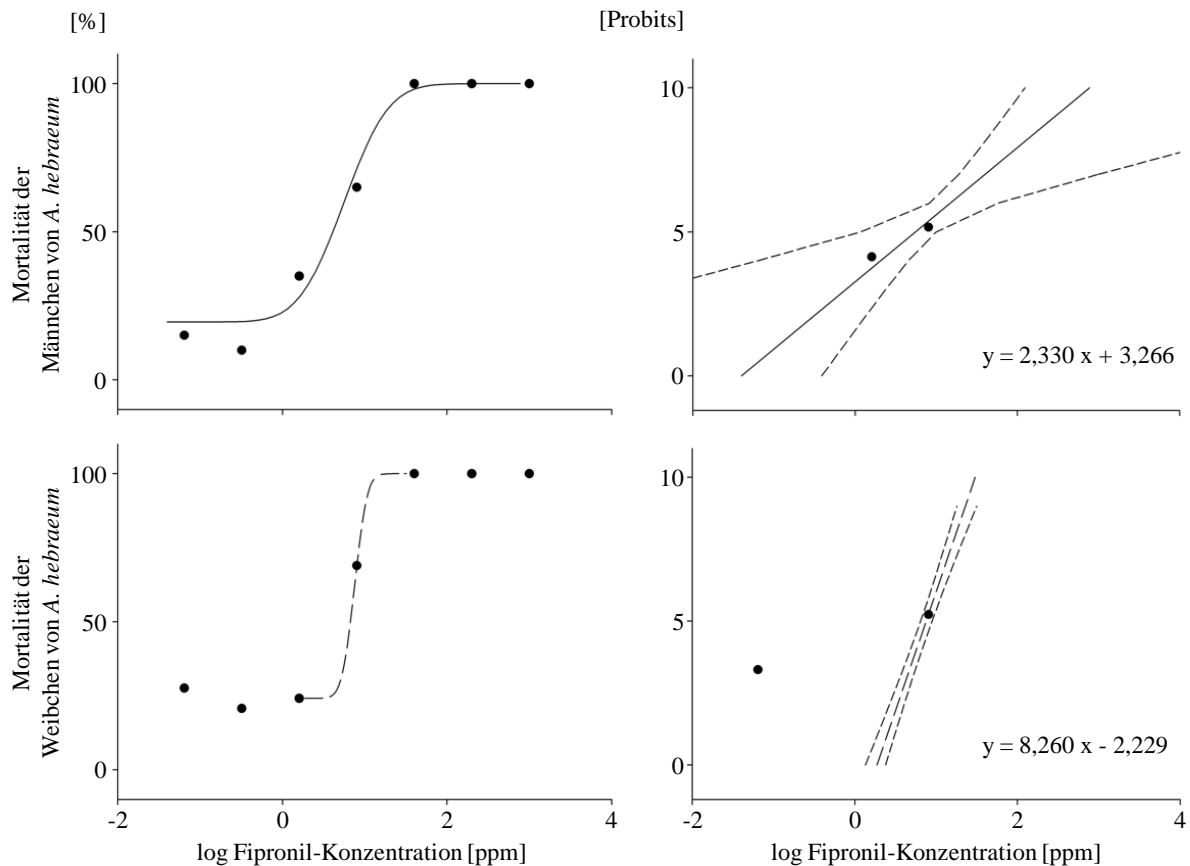


Abb. 11: Anteil der toten ungesogenen Adulten ($n = 20$ [Männchen]; $n = 29$ [Weibchen]) von *A. hebraeum* in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Fipronil-Konzentrationen 14 Tage nach der Behandlung. Kurven stellen berechnete Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Prozent oder Probits mit 95 % Fiduzialintervall dar. Als Kontrollsubstanz diente 5 % DMSO. Die Kontrollmortalität lag für Weibchen bei 24,1 % und für Männchen bei 19,5 %. Der LC_{50} -Wert lag für die Männchen bei einer Konzentration von circa 5,55 (1,17 – 10,0) ppm und für die Weibchen bei einer Konzentration von circa 7,50 (6,40 - 8,86) ppm.

2.3.2 Ermittlung der konzentrationsabhängigen Wirkungsgrade von MA-K und MA-7

2.3.2.1 Nymphen

Die Kontrollmortalität bei der Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Beziehung für die *M. anisopliae*-Stämme lag bei 12,5 %. Die ersten toten Zecken wurden elf Tage nach der Behandlung mit der Konidiensuspension erfasst. Innerhalb einer Woche nach dem Schlupf starben $8,6 \pm 5,47$ % der Adulten durch die Wirkung von MA-K oder MA-7. Insgesamt konnte von 92,2 % der toten Zecken einer der beiden *M. anisopliae*-Stämme isoliert werden. Es gab zwischen den beiden Stämmen kaum Unterschiede in ihrer Wirkung ($\chi^2 \leq 1,01$, $p \geq 0,31$). Lediglich bei $1,0 \times 10^2$ Konidien/ml starben mehr Nymphen durch MA-7 ($\chi^2 = 4,02$, $p = 0,045$). Jedoch lag in diesem Fall kein Unterschied zur Mortalität in der Kontrolle vor ($\chi^2 \leq 2,81$, $p \geq 0,094$).

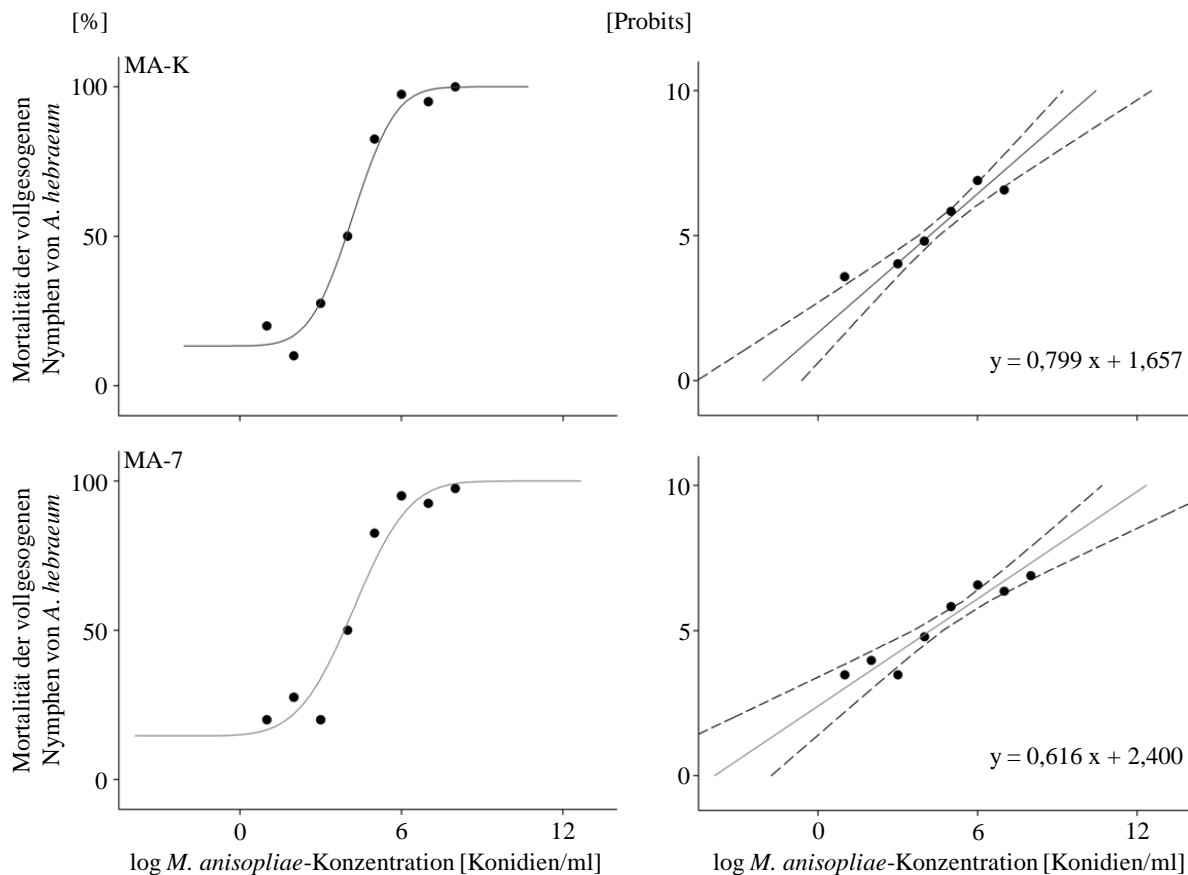


Abb. 12: Anteil der nicht zu Adulten geschlüpften Nymphen von *A. hebraeum* (n = 40) in Abhängigkeit von den unterschiedlichen MA-K- und MA-7-Konzentrationen 63 Tage nach der Behandlung. Kurven stellen berechnete Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Prozent oder Probits mit 95 % Fiduzialintervall dar. Als Kontrollsubstanz diente 0,05 % Tween80. Die Kontrollmortalität lag bei 12,5 % und der LC₅₀-Wert lag für MA-7 bei einer Konzentration von $1,67 \times 10^4$ ($3,68 \times 10^3 - 4,78 \times 10^4$) Konidien/ml und für MA-K bei einer Konzentration von $1,54 \times 10^4$ ($5,76 \times 10^3 - 3,39 \times 10^4$) Konidien/ml.

Bis zu Konzentrationen von $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml waren keine Unterschiede in der Mortalität zwischen Pilz- und Kontrollbehandlung zu beobachten ($\chi^2 \leq 2,81$, $p \geq 0,094$). Bei Behandlung mit Konzentrationen von $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml oder mehr von MA-K oder MA-7 starben mehr Nymphen als in der Kontrolle und bei $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml MA-K starben alle Nymphen ($\chi^2 \geq 13,1$, $p < 0,001$) (Abb. 12). Daraus errechnet sich nach 63 Tagen ein LC₅₀-Wert für MA-7 von $1,67 \times 10^4$ ($3,68 \times 10^3 - 4,78 \times 10^4$) Konidien/ml und für MA-K von $1,54 \times 10^4$ ($5,76 \times 10^3 - 3,39 \times 10^4$) Konidien/ml. Die LC₉₅-Werte lagen bei $7,83 \times 10^6$ ($2,27 \times 10^6 - 5,62 \times 10^7$) Konidien/ml (MA-7) und $1,76 \times 10^6$ ($6,37 \times 10^5 - 8,25 \times 10^6$) Konidien/ml (MA-K). Für die Kombinationsversuche wurden $1,0 \times 10^3$ und 10^4 Konidien/ml für MA-K und MA-7 ausgewählt.

2.3.2.2 Ungesogene Adulte

Die Kontrollmortalität lag bei den Weibchen bei 5 – 5,23 % und bei den Männchen bei 0 %. Die ersten Toten konnten sieben Tage nach der Behandlung mit der Konidiensuspension beobachtet werden. Insgesamt konnte von 36,9 % der toten Weibchen und 33,8 % der toten Männchen einer der beiden *M. anisopliae*-Stämme isoliert werden.

Behandlungen mit bis zu $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml von MA-K oder MA-7 hatten keinen Effekt auf Weibchen und Männchen ($\chi^2 \leq 3,33$, $p \geq 0,07$), mit Ausnahme von der Behandlung von $1,0 \times 10^3$ MA-7, durch die mehr Männchen als in der Kontrolle starben ($\chi^2 = 7,50$, $p = 0,006$). Es starben mehr Männchen nach Behandlung mit Konzentrationen von $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml oder mehr (MA-K oder MA-7) als nach Behandlung mit Tween ($\chi^2 \geq 7,50$, $p \leq 0,006$).

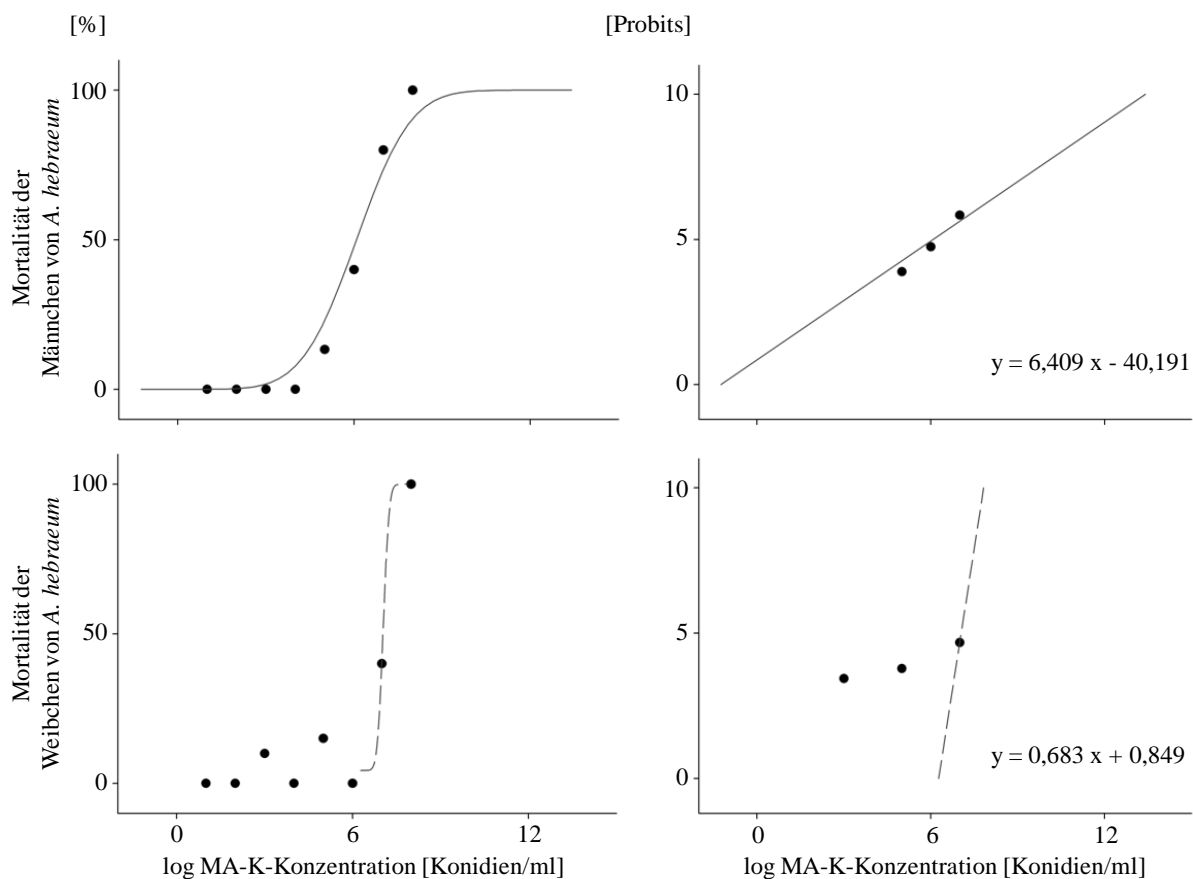


Abb. 13: Anteil der toten ungesogenen Adulten ($n = 15$ [Männchen]; $n = 20$ [Weibchen]) von *A. hebraeum* in Abhängigkeit von den unterschiedlichen MA-K-Konzentrationen 28 Tage nach der Behandlung. Kurven stellen berechnete Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Prozent oder Probits mit 95 % Fiduzialintervall dar. Als Kontrollsubstanz diente 0,05 % Tween80. Die Kontrollmortalität lag bei den Weibchen bei 5,23 % und bei den Männchen bei 0 %. Der LC_{50} -Wert lag für die Männchen bei einer Konzentration von $1,21 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K und für die Weibchen bei $1,12 \times 10^7$ Konidien/ml MA-K.

Bei den Weibchen erzielten Konzentrationen ab $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-7 ebenfalls höhere Mortalitäten im Vergleich zur Kontrolle ($\chi^2 \geq 7,03$, $p \leq 0,008$); für MA-K galt dieses aber erst ab Konzentration von $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml ($\chi^2 = 6,62$, $p = 0,01$). Nach Behandlung mit $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml MA-K starben alle Weibchen ($\chi^2 = 35,2$, $p < 0,001$).

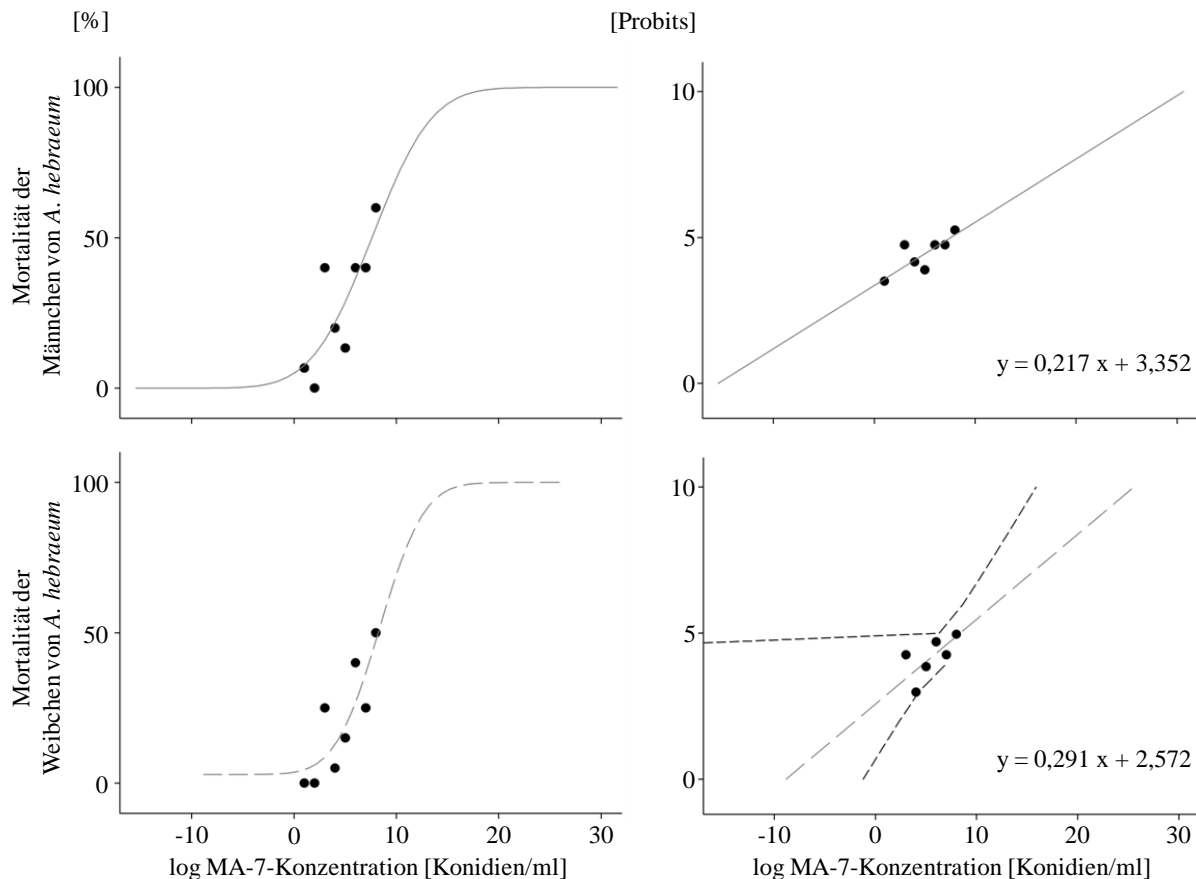


Abb. 14: Anteil der toten ungesogenen Adulten ($n = 15$ [Männchen]; $n = 20$ [Weibchen]) von *A. hebraeum* in Abhängigkeit von den unterschiedlichen MA-7-Konzentrationen 28 Tage nach der Behandlung. Kurven stellen berechnete Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Prozent oder Probits mit 95 % Fiduzialintervall dar. Als Kontrollsubstanz diente 0,05 % Tween80. Die Kontrollmortalität lag bei den Weibchen bei 5 % und bei den Männchen bei 0 %. Der LC_{50} -Wert lag für die Männchen bei einer Konzentration von $3,93 \times 10^7$ Konidien/ml MA-7 und für die Weibchen bei $2,24 \times 10^8$ Konidien/ml MA-7.

Bei Behandlung mit MA-K gab es bis zu einer Konzentration von $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml zwischen Männchen und Weibchen keine Unterschiede ($\chi^2 \leq 1,59$, $p \geq 0,21$). Es starben aber mehr Männchen als Weibchen nach Behandlung mit $1,0 \times 10^6$ oder $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml MA-K ($\chi^2 \geq 5,60$, $p \leq 0,018$). Zwischen Männchen und Weibchen gab es keine Unterschiede in den Mortalitäten nach Behandlung mit MA-7 ($\chi^2 \leq 1,91$, $p \geq 0,17$). Zwischen den Pilzstämmen gab es in den meisten Konzentrationen weder für Männchen noch für Weibchen einen Unterschied in der Mortalität ($\chi^2 \leq 3,33$, $p \geq 0,068$). Es starben aber mehr Weibchen

durch $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-7 als durch MA-K ($\chi^2 = 10,0$, $p = 0,002$). Bei $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml starben mehr Weibchen durch MA-K als durch MA-7 ($\chi^2 = 13,3$, $p < 0,001$). Bei den Männchen hingegen starben mehr Versuchstiere nach Behandlung mit MA-7 als nach Behandlung mit MA-K ($1,0 \times 10^3$ Konidien/ml) ($\chi^2 = 7,50$, $p = 0,006$). Außerdem verursachten die höheren Konzentrationen ($1,0 \times 10^7$ und $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml) von MA-K eine höhere Mortalität als die von MA-7 ($\chi^2 \geq 5,0$, $p \leq 0,025$).

Aufgrund der geringen Versuchstieranzahl konnten nur eingeschränkt verlässliche LC_{50} -Werte berechnet und keine Fiduzialintervalle ermittelt werden. Der LC_{50} -Wert für Männchen lag 28 Tagen nach Behandlung für MA-K bei einer Konzentration von $1,21 \times 10^6$ Konidien/ml und für MA-7 bei $3,93 \times 10^7$ Konidien/ml (Abb. 13 und Abb. 14). Für die Männchen ergab sich für MA-K ein LC_{95} -Wert von $3,09 \times 10^8$ Konidien/ml und für MA-7 ein LC_{95} -Wert von $1,49 \times 10^{15}$ Konidien/ml. Für Weibchen wurde für MA-K ein LC_{50} -Wert von $1,12 \times 10^7$ Konidien/ml errechnet und für MA-7 ein LC_{50} -Wert von $2,24 \times 10^8$ Konidien/ml (Abb. 13 und Abb. 14). Die LC_{95} -Werte betragen $2,03 \times 10^7$ Konidien/ml (MA-K) und $1,02 \times 10^{14}$ Konidien/ml (MA-7) für die Weibchen. Es wurden für die Kombinationsversuche $1,0 \times 10^7$ und $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml gewählt.

2.3.3 Versuche mit den Kombinationen aus *M. anisopliae* und Fipronil/Etoxazol

2.3.3.1 Vollgesogene Nymphen

2.3.3.1.1 *M. anisopliae* und Etoxazol

Nach der Behandlung mit 0,05 % Tween80, 1 % DMSO, 0,0064 ppm Etoxazol starben zwischen 12,5 und 16,3 % der behandelten Nymphen (Abb. 15). Trotz der erhöhten Mortalität in der Behandlung mit 0,032 ppm (23,8 %) unterschieden sich die Mortalitäten in den Behandlungen mit DMSO und Etoxazol nicht signifikant voneinander ($\chi^2 \leq 3,17$, $p \geq 0,075$).

2.3.3.1.1.1 MA-K und Etoxazol

Die Mortalität in den Behandlungen mit $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-K allein oder in Kombination mit Etoxazol war höher als die Mortalität in der Tween-Behandlung ($\chi^2 \geq 7,34$, $p \leq 0,007$). Auch die Mortalität in der DMSO-Kontrolle war signifikant niedriger als die in den MA-K-Etoxazol-Kombinationen ($\chi^2 \geq 9,28$, $p \leq 0,002$) (Abb. 15). Die Chancenverhältnisse der Etoxazol-MA-K-Kombinationen waren in etwa doppelt so hoch wie die jeweiligen Etoxazol-Varianten allein (Tab. 4). Der Vergleich der Chancenverhältnisse der MA-K-Variante mit denen der MA-K-Etoxazol-Kombinationen ergab für den Pilz allein ein

höheres Chancenverhältnis (also eine höhere Wahrscheinlichkeit, eine Mortalität zu verursachen) als für die Kombinationen (Tab. 4).

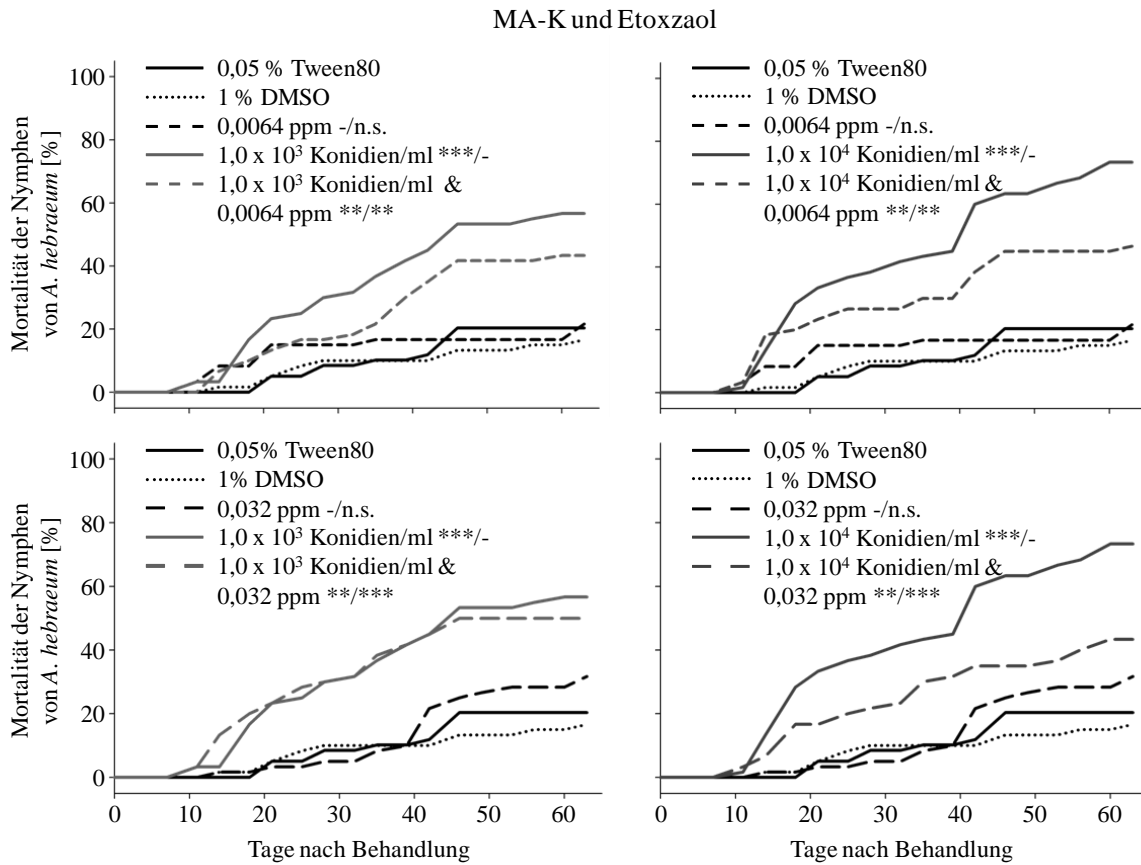


Abb. 15: Mortalität der gesogenen Nymphen von *A. hebraeum* über den Versuchszeitraum von 63 Tagen. Behandelt wurden die Nymphen mit $1,0 \times 10^3$ oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-K und mit 0,0064 oder 0,032 ppm Etoxazol allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO an (Log-Rang-Test mit $df = 1$) ($n = 80$).

Ähnlich verhielt es sich auch für die höhere MA-K-Konzentration ($1,0 \times 10^4$ Konidien/ml), die allein oder in Kombination angewendet wurde. Alle drei Varianten verursachten eine höhere Mortalität als die Tween- oder DMSO-Kontrolle ($\chi^2 \geq 7,58$, $p \leq 0,006$ [Tween], $\chi^2 \geq 9,30$, $p \leq 0,002$ [DMSO]). Die Chancenverhältnisse waren in etwas anderthalb- bis dreimal so hoch wie die der beiden Etoxazol-Varianten. Das Chancenverhältnis von $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml MA-K allein war aber doppelt so hoch wie die Chancenverhältnisse der Kombinationen (Tab. 4).

Tab. 4: χ^2 - und p-Werte des Log-Rang-Tests (df = 1) zur Mortalität der vollgesogenen Nymphen von *A. hebraeum* und die Chancenverhältnisse (CV) der Behandlungen zu den Kontrollen. Behandelt wurden die Nymphen mit $1,0 \times 10^3$ oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-K bzw. MA-7 und mit 0,0064 oder 0,032 ppm Etoxazol allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO (n = 80).

Behandlung	Kontrolle	0,05 % Tween80			1 % DMSO		
		χ^2 -Wert	p-Wert	CV	χ^2 -Wert	p-Wert	CV
Etoxazol [ppm]	0,0064				0,5	0,47	1,4
	0,032				3,2	0,075	2,2
MA-K	$1,0 \times 10^3$						
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^3$ &	0,0064	16,2	<0,001	4,2		
Etoxazol [ppm]	$1,0 \times 10^3$ &	0,032	7,3	0,007	2,7	9,3	0,002
	$1,0 \times 10^3$ &	0,0064	11,9	0,001	3,4	14,1	<0,001
	$1,0 \times 10^4$		31,0	<0,001	6,9		
	$1,0 \times 10^4$ &	0,0064	9,5	0,002	3,1	11,8	0,001
	$1,0 \times 10^4$ &	0,032	7,6	0,006	2,7	9,3	0,002
MA-7	$1,0 \times 10^3$		3,6	0,059	2,0		
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^3$ &	0,0064	3,4	0,066	2,0	4,8	0,028
Etoxazol [ppm]	$1,0 \times 10^3$ &	0,032	0,6	0,426	1,3	1,4	0,236
	$1,0 \times 10^4$		9,3	0,002	3,1		
	$1,0 \times 10^4$ &	0,0064	11,6	0,001	3,4	13,7	<0,001
	$1,0 \times 10^4$ &	0,032	11,2	0,001	3,4	13,3	<0,001

2.3.3.1.1.2 MA-7 und Etoxazol

Die Mortalität in den Behandlungen mit $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-7 allein oder in Kombination mit 0,0064 ppm Etoxazol war nur tendenziell höher als die in der Tween-Kontrolle ($\chi^2 \geq 3,38$, $p \leq 0,066$) (Abb. 16). Die Kombination verursachte aber eine höhere Mortalität als die DMSO-Kontrolle ($\chi^2 = 4,81$, $p = 0,028$). Die Mortalität in der Kombination von $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml und 0,032 ppm Etoxazol unterschied sich nicht von der in der Tween- oder DMSO-Kontrolle ($\chi^2 \leq 1,41$, $p \geq 0,24$). Das Chancenverhältnis der Kombination von $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml und 0,0064 ppm Etoxazol war in etwa doppelt so hoch wie das von 0,0064 ppm allein. Für die Kombination mit 0,032 ppm war das Chancenverhältnis allerdings um circa ein Drittel niedriger als das von Etoxazol allein. Das Chancenverhältnis von $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml allein war identisch mit dem der Kombination aus $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml und 0,0064 ppm. Die höhere Etoxazol-Konzentration wies in Kombination mit MA-7 allerdings ein geringeres Chancenverhältnis auf (Tab. 4).

Die Konzentration von $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml, die allein oder in Kombination angewendet wurde, verursachte eine höhere Mortalität als die Tween- oder DMSO-Kontrolle ($\chi^2 \geq 9,30$,

$p \leq 0,002$ [Tween], $\chi^2 \geq 13,31$, $p < 0,001$ [DMSO]). Die Chancenverhältnisse der beiden MA-7-Etoxazol-Varianten waren identisch und wiesen ein zwei- (0,032 ppm) bis dreimal (0,0064 ppm) so hohes Chancenverhältnis wie die Etoxazol-Konzentrationen auf, unterschieden sich aber kaum vom Chancenverhältnis der MA-7-Variante (Tab. 4).

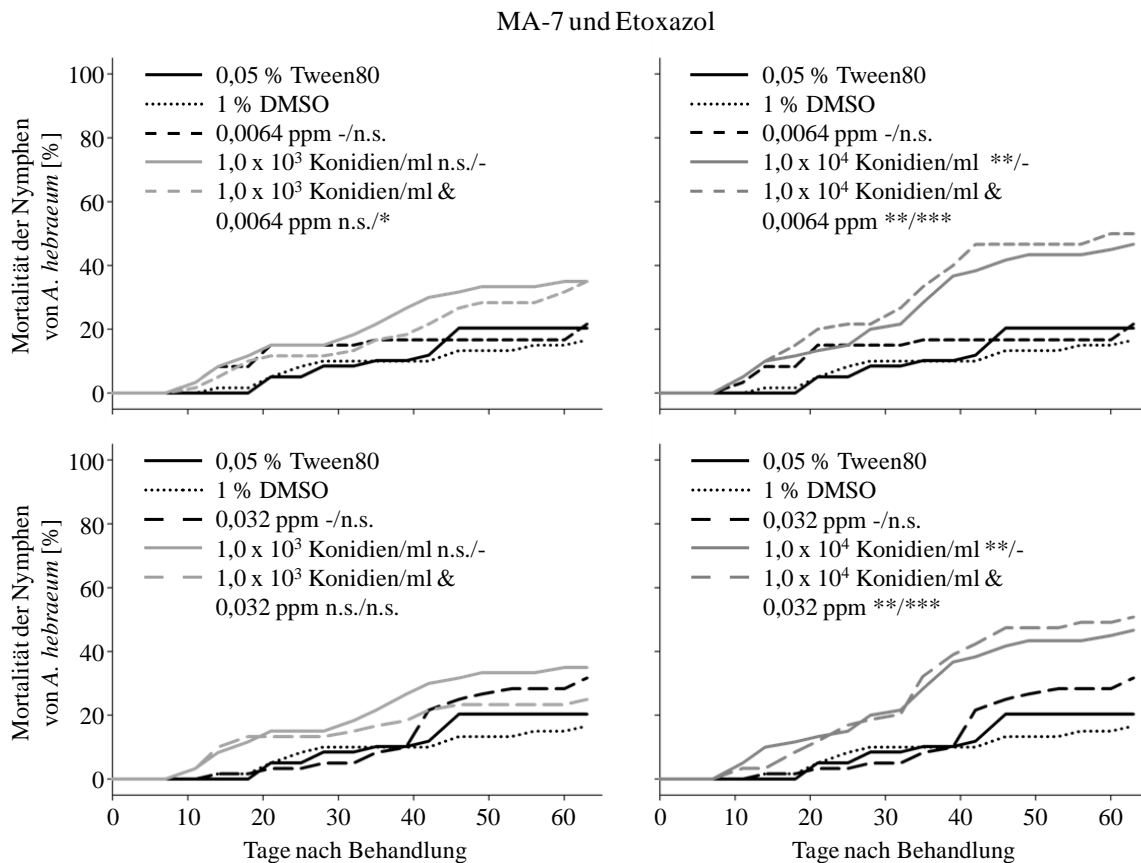


Abb. 16: Mortalität der gesogenen Nymphen von *A. hebraeum* über den Versuchszeitraum von 63 Tagen. Behandelt wurden die Nymphen mit $1,0 \times 10^3$ oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-7 und mit 0,0064 oder 0,032 ppm Etoxazol allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05% Tween80 und 1% DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05% Tween80/1% DMSO an (Log-Rang-Test mit $df = 1$) ($n = 80$).

2.3.3.1.1.3 Schlupf zu Adulten

Der Schlupf der Nymphen zu Adulten setzte 28 Tage nach der Behandlung ein und dauerte bis maximal zum 60. Tag nach der Behandlung. Die meisten Adulten ($\sim 27\%$) schlüpften am 35. Tag nach der Behandlung. Der Großteil der Kombinations-Behandlungen hatte auf den Schlupfzeitraum der Adulten keinen Einfluss. Die Schlupfzeiträume in den Kombinations-Behandlungen unterschieden sich nicht von denen in den Behandlungen mit Tween, DMSO, MA-K bzw. MA-7 oder Etoxazol (Abb. 17). Einzig Nymphen, die mit einer Kombination aus $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-K und 0,032 ppm Etoxazol behandelt wurden, schlüpften später

als die nur mit Tween oder MA-K behandelten Tiere ($U \geq 877$, $p \leq 0,032$). Allerdings war der Schlupfzeitpunkt gleich dem der Nymphen, die mit DMSO oder 0,032 ppm Etoxazol behandelt wurden ($U \leq 1433$, $p \geq 0,12$).

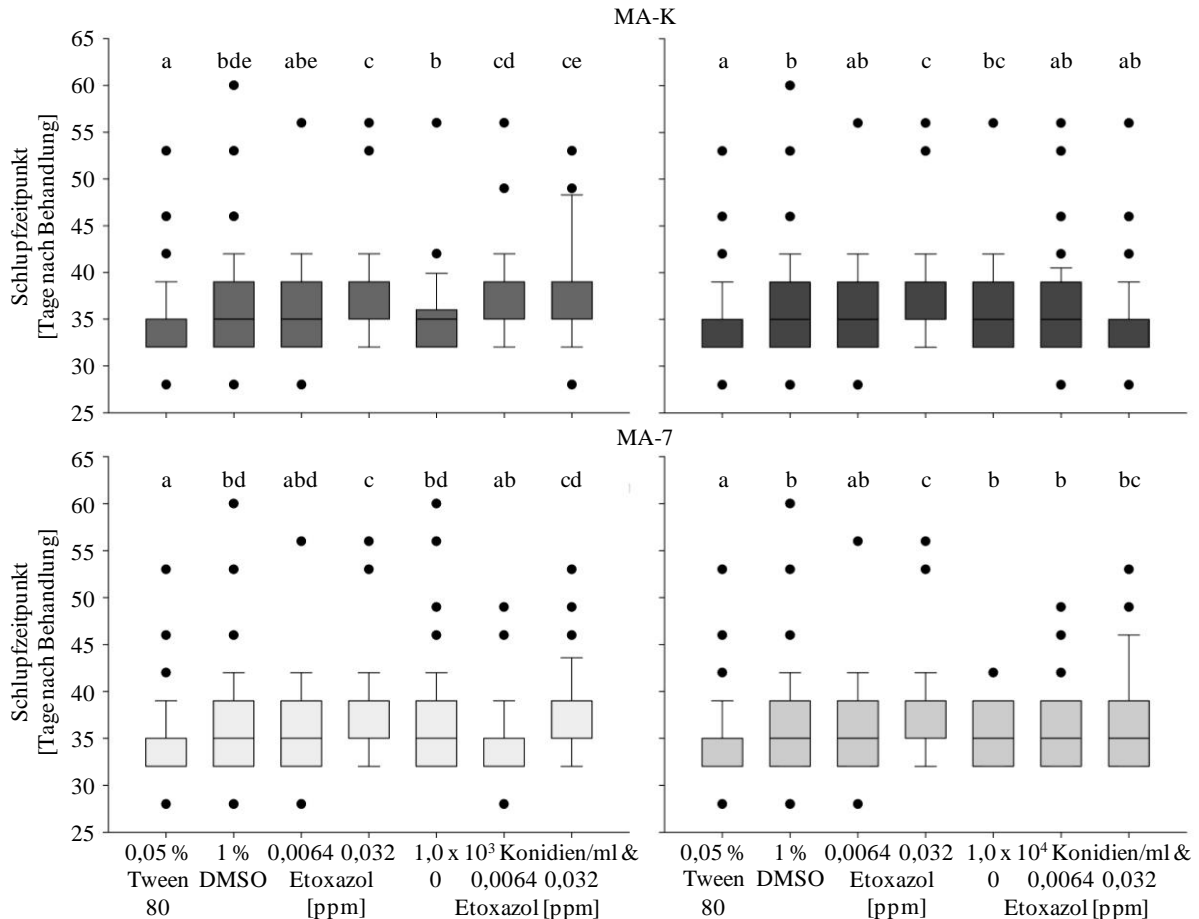


Abb. 17: Schlupfzeitpunkte in Tagen nach der Behandlung. Behandelt wurden die vollgesogenen Nymphen von *A. hebraeum* mit $1,0 \times 10^3$ oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-K bzw. MA-7 und mit 0,0064 oder 0,032 ppm Etoxazol allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Boxplots mit verschiedenen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich mit $p < 0,05$ (U-Test nach Mann und Whitney) ($n = 80$).

2.3.3.1.1.4 Gesamtmortalität

Die Gesamtmortalität ergab sich aus den toten Nymphen und den Adulten, die innerhalb von 14 Tagen nach ihrem Schlupf starben. Diese war in den Behandlungen von 0,05 % Tween80, 1 % DMSO und 0,0064 ppm Etoxazol gleich der Nymphenmortalität ($Z = 0,00$, $p = 1,00$). Es starben aber einige frischgeschlüpfte Adulte, die als Nymphen mit 0,032 ppm Etoxazol behandelt worden waren, so dass sich die Gesamt- gegenüber der Nymphenmortalität deutlich erhöhte ($Z = -4,36$, $p < 0,001$). Die Gesamtmortalität in allen Varianten mit MA-K und MA-7 war höher als die Nymphenmortalität (mit Ausnahme der Behandlung von $1,0 \times 10^3$

Konidien/ml MA-K allein) ($Z \leq -2,00$, $p \leq 0,046$) (Abb. 18). Die Gesamtmortalitäten in den Behandlungen von 1 % DMSO und 0,0064 ppm unterschieden sich nicht signifikant ($\chi^2 = 0,4$, $p = 0,532$). Die Gesamtmortalität von 0,032 ppm war dem gegenüber deutlich höher als die von 1 % DMSO ($\chi^2 = 16,3$, $p < 0,001$).

MA-K und Etoxazol

Sowohl $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-K als auch die beiden Kombinationen verursachten eine höhere Gesamtmortalität als die Tween- oder DMSO-Kontrolle ($\chi^2 \geq 13,9$ $p \leq 0,001$) (Abb. 18).

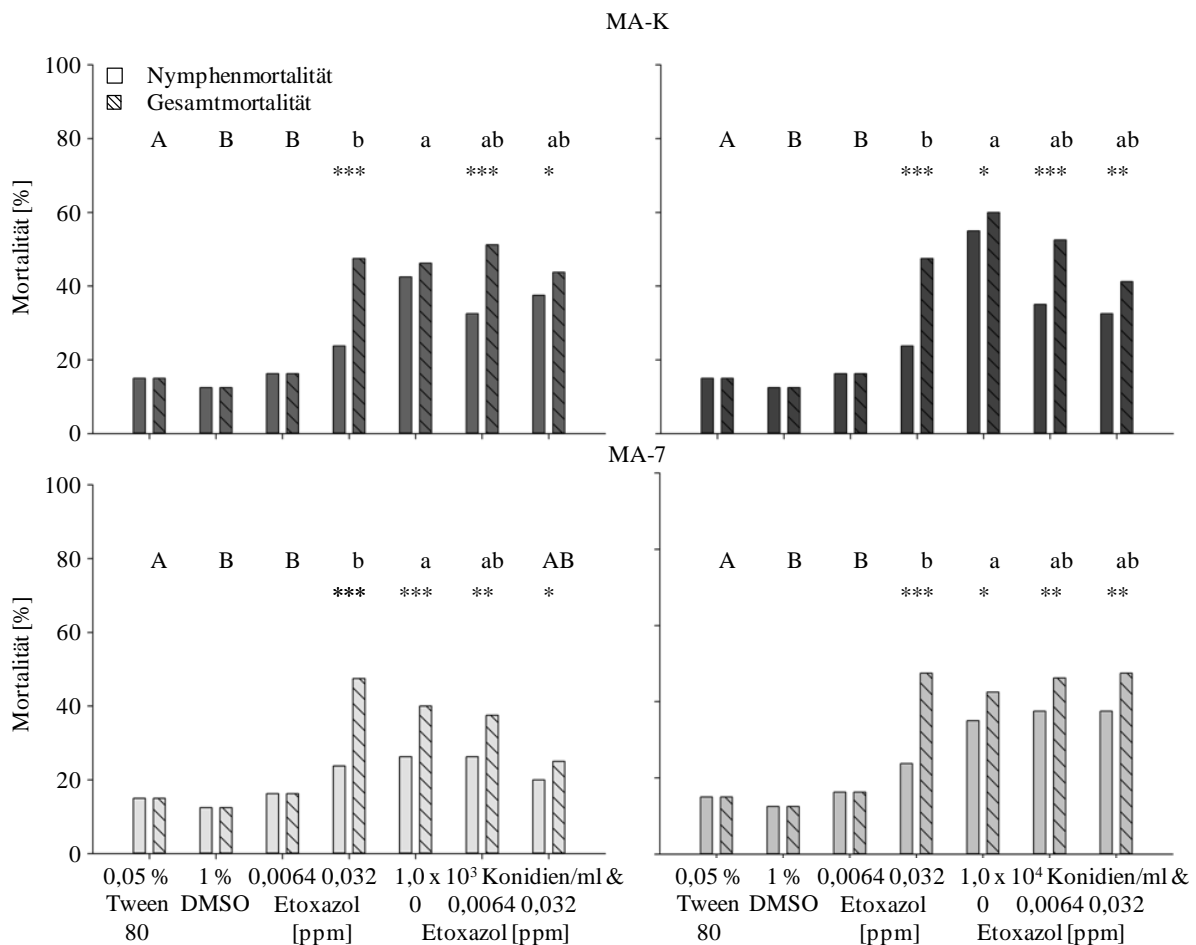


Abb. 18: Anteil der vor dem Schlupf zur Adulten gestorbenen Nymphen (Nymphenmortalität) und der Anteil der nicht geschlüpften Adulten sowie innerhalb von 14 Tagen nach dem Schlupf gestorbenen Adulten (Gesamtmortalität) von *A. hebraeum*. Die vollgesogenen Nymphen wurden mit $1,0 \times 10^3$ oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-K bzw. MA-7 und mit 0,0064 oder 0,032 ppm Etoxazol allein und in Kombination behandelt. Als Kontrollsubstanz diente 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen der Nymphen- und der Gesamtmortalität an (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Kleine Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede der Varianten zu den Kontrollen (A für Tween und B für DMSO) mit $p < 0,05$ an (χ^2 -Test) ($n = 80$).

Das Chancenverhältnis der MA-K-Kombination mit 0,0064 ppm Etoxazol war fünffach höher als das von 0,0064 ppm Etoxazol allein. Das Chancenverhältnis von $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml mit 0,032 ppm Etoxazol war hingegen etwas geringer als das von 0,032 ppm. Aber nur die Kombination mit 0,0064 ppm Etoxazol hatte ein höheres Chancenverhältnis als $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-K (Tab. 5).

Die Gesamtmortalität in der Behandlung mit $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml MA-K allein und in den Kombinationen unterschied sich von der Tween-Kontrolle ($\chi^2 \geq 9,80$, $p \leq 0,002$). Des Weiteren war die Gesamtmortalität in den Kombinationen höher als die in der DMSO-Kontrolle ($\chi^2 \geq 12,3$, $p < 0,001$). Das Chancenverhältnis von 0,0064 ppm Etoxazol war deutlich geringer als das der MA-K-Etoxazol-Kombination (Tab. 5). Hingegen war das Chancenverhältnis der Kombination aus MA-K und 0,032 ppm Etoxazol um circa ein Fünftel geringer als das von Etoxazol allein. Die Kombination mit der geringeren Etoxazol-Konzentration wies ein um ein Viertel niedrigeres Chancenverhältnis auf als MA-K allein; das der Kombination mit der höheren Etoxazol-Konzentration war hingegen nicht einmal halb so hoch wie das des Pilzes. Es ergaben sich insgesamt gesehen additive Effekte für die Kombination mit der niedrigeren Etoxazol-Konzentration und antagonistische Effekte für die Kombination mit der höheren Etoxazol-Konzentration (Tab. 5).

MA-7 und Etoxazol

Die Gesamtmortalität in der Pilzbehandlung mit $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-7 unterschied sich sowohl allein als auch in Kombination mit 0,0064 ppm Etoxazol signifikant von der in der Tween-Kontrolle ($\chi^2 \geq 7,71$, $p \leq 0,005$) (Abb. 18). Diese Kombination verursachte auch eine höhere Gesamtmortalität als DMSO ($\chi^2 = 10,0$, $p = 0,002$) und wies ein dreimal so hohes Chancenverhältnis auf wie Etoxazol allein (Tab. 5). Die Mortalität in der Kombinationsbehandlung mit $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-7 und 0,032 ppm Etoxazol hingegen unterschied sich weder von der in der Tween- noch von der in der DMSO-Behandlung ($\chi^2 \leq 3,33$, $p \geq 0,068$). Außerdem war das Chancenverhältnis um Zweidrittel geringer als das von 0,032 ppm Etoxazol allein. Die Chancenverhältnisse waren für MA-7 und die Kombination mit 0,0064 ppm Etoxazol ähnlich. Die Kombination aus $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-7 und 0,032 ppm Etoxazol wies aber einen nur halb so hohen Wert auf wie MA-7 allein (Tab. 5).

Die Behandlung mit $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml MA-7 verursachte sowohl allein als auch in den Kombinationen eine signifikant höhere Mortalität als die Tween- und DMSO-Kontrolle ($\chi^2 \geq 10,5$, $p \leq 0,001$).

Tab. 5: χ^2 - und p-Werte des χ^2 -Tests (df = 1) zur Gesamtmortalität der vollgesogenen Nymphen von *A. hebraeum* und die Chancenverhältnisse (CV) der Behandlungen zu den Kontrollen. Behandelt wurden die Nymphen mit $1,0 \times 10^3$ oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-K bzw. MA-7 und mit 0,0064 oder 0,032 ppm Etoxazol allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05% Tween80 und 1% DMSO. Zusätzlich wurde für Behandlungen, die signifikant unterschiedlich zur Kontrolle waren, eine erwartete Mortalität (M_E) und ein χ^2 -Wert ($\chi^2_{(E)}$) berechnet, um den auftretenden Effekt für die signifikanten Interaktionen in den Kombinationsvarianten zu bestimmen (n = 80).

Behandlung	Kontrolle	0,05 % Tween80			1 % DMSO			M_E	$\chi^2_{(E)}$	Effekt
		χ^2 -Wert	p-Wert	CV	χ^2 -Wert	p-Wert	CV			
Etoxazol [ppm]	0,0064				0,4	0,532	1,4			
	0,032				16,3	<0,001	6,3			
MA-K	$1,0 \times 10^3$	12,8	<0,001	4,9						
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^3$ & 0,0064	15,9	<0,001	6,0	18,8	<0,001	7,4	55,0	0,3	additiv
Etoxazol [ppm]	$1,0 \times 10^3$ & 0,032	11,3	0,001	4,4	13,9	<0,001	5,4	71,8	10,9	antagonistisch
	$1,0 \times 10^4$	21,6	<0,001	8,5						
	$1,0 \times 10^4$ & 0,0064	16,7	<0,001	6,3	19,7	<0,001	7,7	66,5	3,0	additiv
	$1,0 \times 10^4$ & 0,032	9,8	0,002	4,0	12,3	<0,001	4,9	79,0	18,0	antagonistisch
MA-7	$1,0 \times 10^3$	9,1	0,003	3,8						
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^3$ & 0,0064	7,7	0,005	3,4	10,0	0,002	4,2	49,8	3,0	additiv
Etoxazol [ppm]	$1,0 \times 10^3$ & 0,032	2,0	0,157	1,9	3,3	0,068	2,4			
	$1,0 \times 10^4$	10,5	0,001	4,2						
	$1,0 \times 10^4$ & 0,0064	12,8	<0,001	4,9	15,5	<0,001	6,0	51,8	0,6	additiv
	$1,0 \times 10^4$ & 0,032	13,5	<0,001	5,1	16,3	<0,001	6,3	69,8	7,1	antagonistisch

MA-7 in Kombination mit 0,0064 ppm hatte ein viereinhalbfach höheres Chancenverhältnis als Etoxazol allein, wohingegen das Chancenverhältnis von 0,032 ppm und der dazugehörigen Kombination gleich waren. Das Chancenverhältnis von $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml in Kombination mit 0,0064 ppm Etoxazol war leicht höher als das von MA-7 allein. Die Kombination mit 0,032 ppm wies jedoch ein höheres Chancenverhältnis auf (Tab. 5). Auch hier ergab sich, dass die Effekte der Kombinationen mit der niedrigeren Etoxazol-Konzentration additiv waren, während die mit der höheren Etoxazol-Konzentration antagonistisch (nur die Kombination aus $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml und 0,032 ppm Etoxazol) waren (Tab. 5).

2.3.3.1.2 *M. anisopliae* und Fipronil

Bei 0,05 % Tween80, 1 % DMSO, 0,32 und 1,6 ppm Fipronil starben zwischen 10 % und 15 % der behandelten Nymphen. Die Mortalität in den Behandlungen von 0,32 und 1,6 ppm Fipronil und DMSO unterschied sich aber nicht signifikant voneinander ($\chi^2 \leq 0,13$, $p \geq 0,71$).

2.3.3.1.2.1 MA-K und Fipronil

Weder $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-K noch die beiden Kombinationen verursachten eine höhere Mortalität als die Tween-Kontrolle ($\chi^2 \leq 0,37$, $p \geq 0,54$) (Abb. 19). Es gab auch keine Unterschiede zwischen der Mortalität in den Kombinationsbehandlungen und der in der DMSO-Kontrolle ($\chi^2 \leq 1,96$, $p \geq 0,16$). Die Chancenverhältnisse der Kombinationen waren circa doppelt so hoch wie die der Fipronil-Varianten, dagegen waren die der MA-K-Behandlungen allein und die der Kombinationen sehr ähnlich und lagen alle bei ungefähr 1 (Tab. 6).

Durch die Behandlung mit $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml MA-K starben mehr Nymphen als durch die mit Tween ($\chi^2 = 4,40$, $p = 0,036$). Die Mortalität der Nymphen hingegen, die mit MA-K in Kombination mit 0,32 oder 1,6 ppm Fipronil behandelt wurden, unterschied sich nicht von den Kontrollen ($\chi^2 \leq 3,38$, $p \geq 0,066$). Das Chancenverhältnis von $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml in Kombination mit 0,32 ppm war in etwa doppelt so hoch wie das von 0,32 ppm Fipronil. Die Chancenverhältnisse von 1,6 ppm Fipronil und der dazugehörigen MA-K-Kombination waren hingegen identisch. MA-K allein hatte ein anderthalb- bis dreimal so hohes Chancenverhältnis wie die Kombinationen (Tab. 6).

MA-K und Fipronil

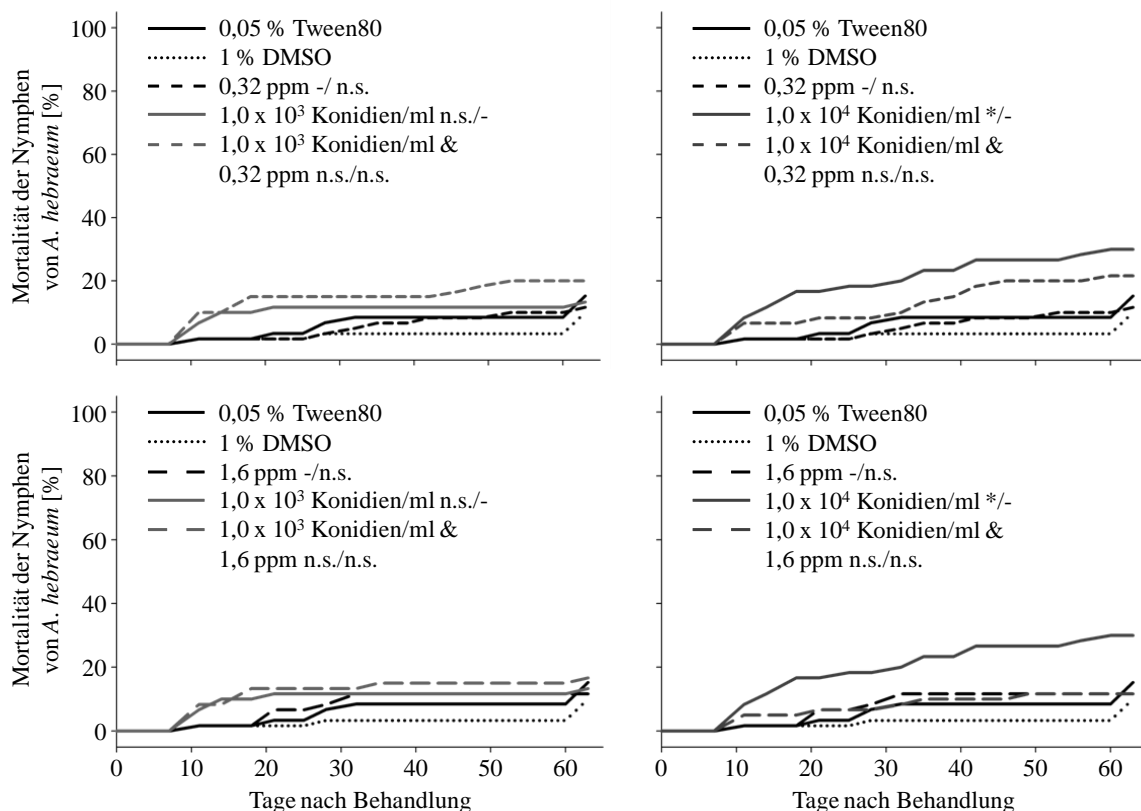


Abb. 19: Mortalität der vollgesogenen Nymphen von *A. hebraeum* über den Versuchszeitraum von 63 Tagen. Behandelt wurden die Nymphen mit $1,0 \times 10^3$ oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-K und mit 0,32 oder 1,6 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO an (Log-Rang-Test mit $df = 1$) ($n = 60$).

2.3.3.1.2.2 MA-7 und Fipronil

In den Behandlungen mit $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-7 allein oder in Kombination mit 0,32 oder 1,6 ppm Fipronil war die Mortalität nicht unterschiedlich zu der in der Tween- oder DMSO-Kontrolle ($\chi^2 \leq 1,36$, $p \geq 0,24$). Die Chancenverhältnisse der Kombinationen waren leicht höher als die der Fipronil-Behandlungen. Die Pilzvarianten hatten gegenüber Tween alle ein Chancenverhältnis von circa 1 (Tab. 6).

Die Behandlung mit $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml MA-7 allein oder in Kombination mit 1,6 ppm Fipronil verursachte eine höhere Mortalität als die Tween-Behandlung ($\chi^2 \geq 6,45$, $p \leq 0,011$) (Abb. 20). Es gab jedoch keinen Unterschied zwischen der Mortalität in der MA-7 Kombination mit 0,32 ppm und der Tween-Kontrolle ($\chi^2 = 1,13$, $p = 0,29$). Die Mortalität in der Kombinationsbehandlung von $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml MA-7 mit 0,32 ppm war nur tendenziell unterschiedlich zu der in der DMSO-Kontrolle, während die Mortalität in der Behandlung mit 1,6 ppm höher war als die in der DMSO-Kontrolle ($\chi^2 = 3,43$, $p = 0,06$

[0,32 ppm], $\chi^2 = 10,8$, $p = 0,001$ [1,6 ppm]). Die Chancenverhältnisse der Kombinationen waren in etwa zweieinhalbfach (0,32 ppm) bzw. viermal (1,6 ppm) so hoch wie die Einzelvarianten von Fipronil (Tab. 6). Allerdings ergab sich beim Vergleich der Chancenverhältnisse der Kombinationen mit der MA-7-Variante, dass die Chancenverhältnisse der Kombinationen (um ein Fünftel bis die Hälfte) geringer waren als die von MA-7 allein.

Tab. 6: χ^2 - und p-Werte des Log-Rang-Tests (df = 1) zur Mortalität der vollgesogenen Nymphen von *A. hebraeum* und die Chancenverhältnisse (CV) der Behandlungen zu den Kontrollen. Behandelt wurden die Nymphen mit $1,0 \times 10^3$ oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-K bzw. MA-7 und mit 0,32 oder 1,6 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO (n = 60).

Behandlung	Kontrolle	0,05 % Tween80			1 % DMSO		
		χ^2 -Wert	p-Wert	CV	χ^2 -Wert	p-Wert	CV
Fipronil [ppm]	0,32				0,0	0,955	1,0
	1,6				0,1	0,719	1,2
MA-K	$1,0 \times 10^3$	0,0	0,873	0,9			
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^3$ & 0,32	0,4	0,541	1,3	2,0	0,161	2,0
Fipronil [ppm]	$1,0 \times 10^3$ & 1,6	0,1	0,722	1,1	1,3	0,248	1,8
	$1,0 \times 10^4$	4,4	0,036	2,4			
	$1,0 \times 10^4$ & 0,32	1,0	0,313	1,6	3,4	0,066	2,5
	$1,0 \times 10^4$ & 1,6	0,2	0,641	0,7	0,1	0,715	1,2
MA-7	$1,0 \times 10^3$	0,0	0,860	0,9			
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^3$ & 0,32	0,1	0,713	1,1	1,4	0,243	1,8
Fipronil [ppm]	$1,0 \times 10^3$ & 1,6	0,0	0,945	1,0	0,8	0,368	1,6
	$1,0 \times 10^4$	9,1	0,003	3,5			
	$1,0 \times 10^4$ & 0,32	1,1	0,288	1,6	3,4	0,064	2,5
	$1,0 \times 10^4$ & 1,6	6,5	0,011	2,9	10,8	0,001	4,6

MA-7 und Fipronil

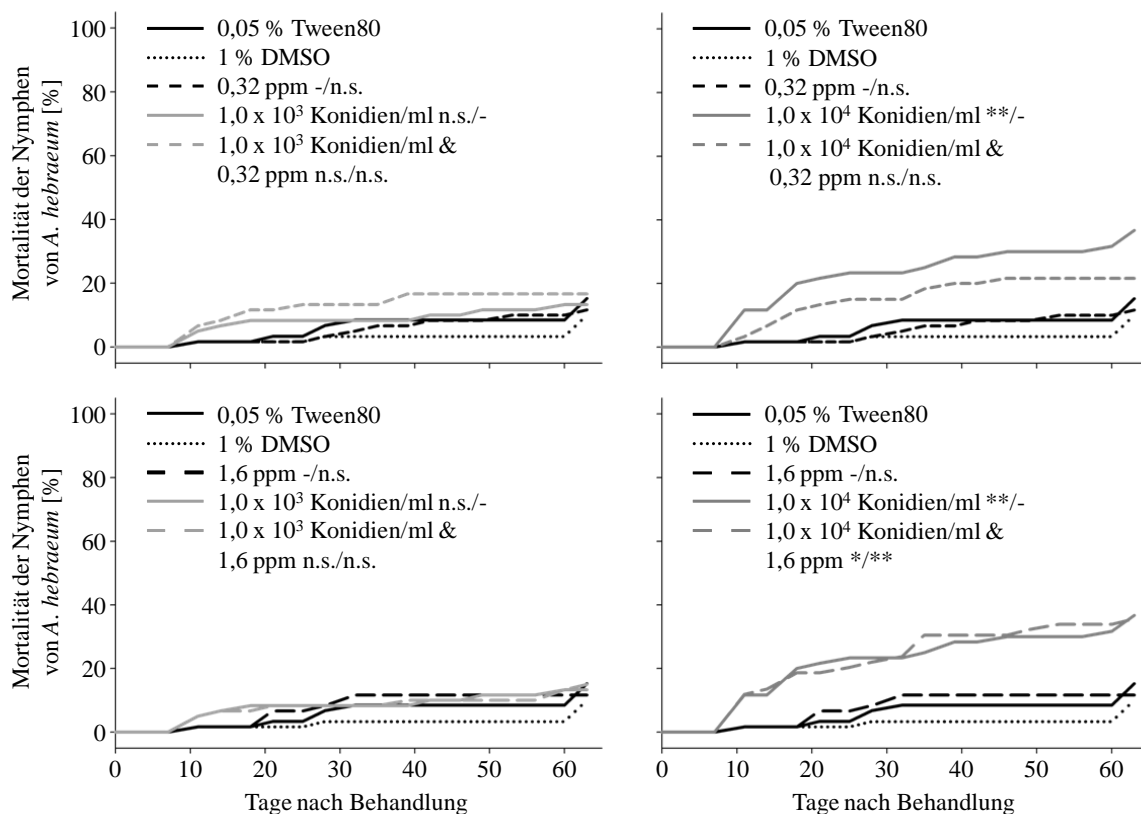


Abb. 20: Mortalität der vollgesogenen Nymphen von *A. hebraeum* über den Versuchszeitraum von 63 Tagen. Behandelt wurden die Nymphen mit $1,0 \times 10^3$ oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-7 und mit 0,32 oder 1,6 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO an (Log-Rang-Test mit $df = 1$) ($n = 60$).

2.3.3.1.2.3 Schlupf zu den Adulten

Der Schlupf der Nymphen zu Adulten setzte 32 Tage nach der Behandlung ein und dauerte bis zum Ende des Versuchs am 63. Tag nach der Behandlung. Die meisten Adulten (~ 38 %) schlüpften am 35. Tag nach der Behandlung. Der Großteil der Kombinationsbehandlungen hatte auf den Schlupfzeitraum der Adulten keinen Einfluss. Der Schlupfzeitraum der Kombinationen unterschied sich weder von dem der Kontrollen, noch von dem der Pilz- und der Fipronil-Einzelbehandlungen (Abb. 21). Einzig Nymphen, die mit $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml von MA-K in Kombination mit 0,32 ppm oder 1,6 ppm Fipronil behandelt wurden, schlüpften später als die nur mit MA-K behandelten Nymphen ($U \geq 747$, $p < 0,001$). Nur die mit MA-K und 1,6 ppm Fipronil behandelten Nymphen schlüpften auch signifikant später zu Adulten als Nymphen der entsprechenden Fipronil-Behandlung ($U = 924$, $p = 0,004$). Es schlüpften allerdings die Nymphen, die mit 1 % DMSO behandelt waren, ähnlich spät wie die Nymphen in den Kombinationsbehandlungen ($U \leq 1245$, $p \geq 0,72$).

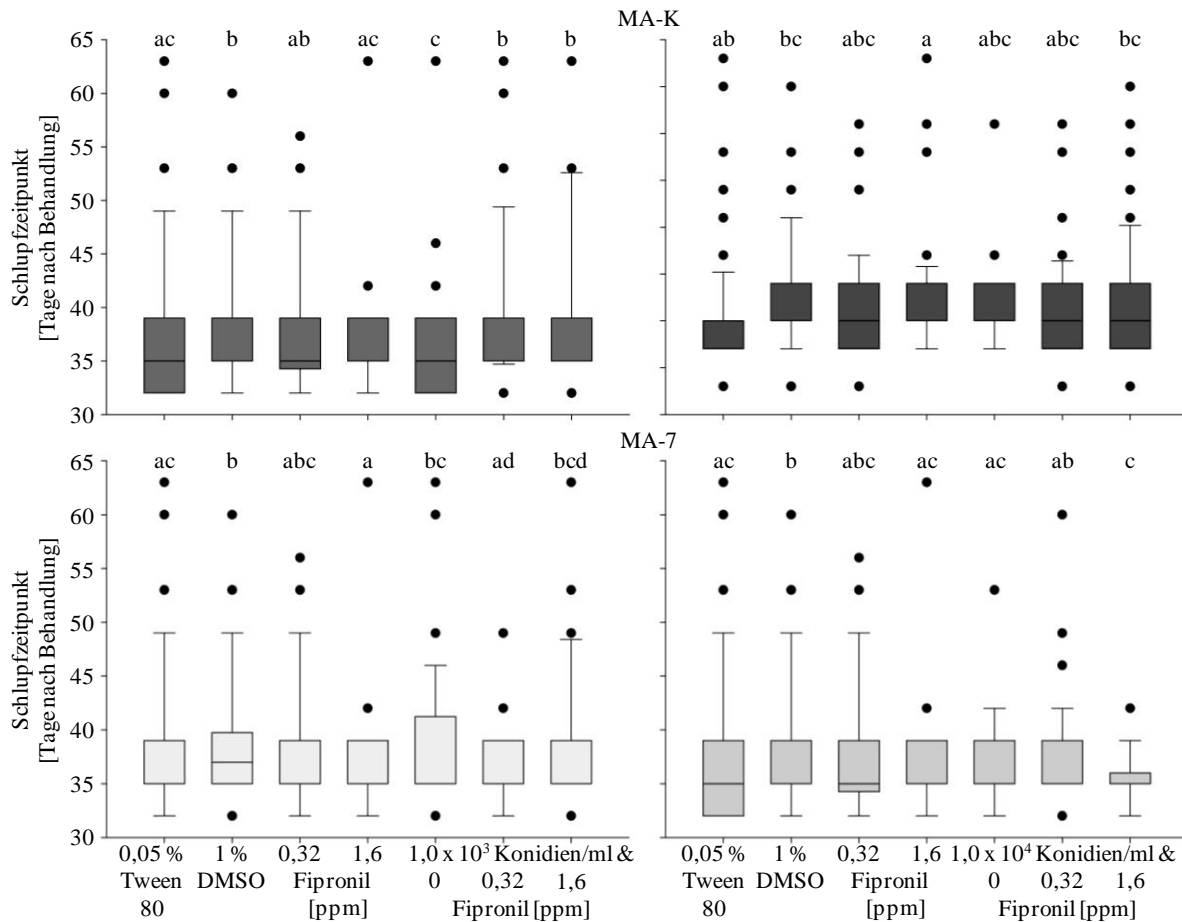


Abb. 21: Schlupfzeitpunkte (in Tagen nach Behandlung). Behandelt wurden die vollgesogenen Nymphen von *A. hebraeum* mit $1,0 \times 10^3$ oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-K bzw. MA-7 und mit 0,32 oder 1,6 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Boxplots mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich mit $p < 0,05$ (U-Test nach Mann und Whitney) ($n = 60$).

2.3.3.1.2.4 Gesamtmortalität

Bei 0,05 % Tween80, 1 % DMSO, 0,32 und 1,6 ppm Fipronil starb keine geschlüpfte Adulte, so dass die Nymphenmortalität gleich der Gesamtmortalität war ($Z \geq -1,41$, $p \geq 0,16$). Auch $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-K allein oder in Kombination mit 0,32 ppm Fipronil erzeugte keine höhere Gesamt- als Nymphenmortalität ($Z \geq -1,73$, $p \geq 0,083$). Die Gesamtmortalitäten in den Behandlungen von $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-K mit 1,6 ppm Fipronil sowie von allen Varianten mit einer Konzentration von $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml MA-K waren signifikant höher als die Nymphenmortalitäten ($Z \leq -2,00$, $p \leq 0,046$). Auch verursachten alle Varianten von MA-7 (bis auf $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml in Kombination mit 0,32 ppm) eine höhere Gesamt- als Nymphenmortalität ($Z \leq -2,65$, $p \leq 0,008$). Die Gesamtmortalität in den Behandlungen von 1 % DMSO, 0,32 und 1,6 ppm unterschied sich nicht signifikant voneinander ($\chi^2 = 0,33$, $p = 0,68$).

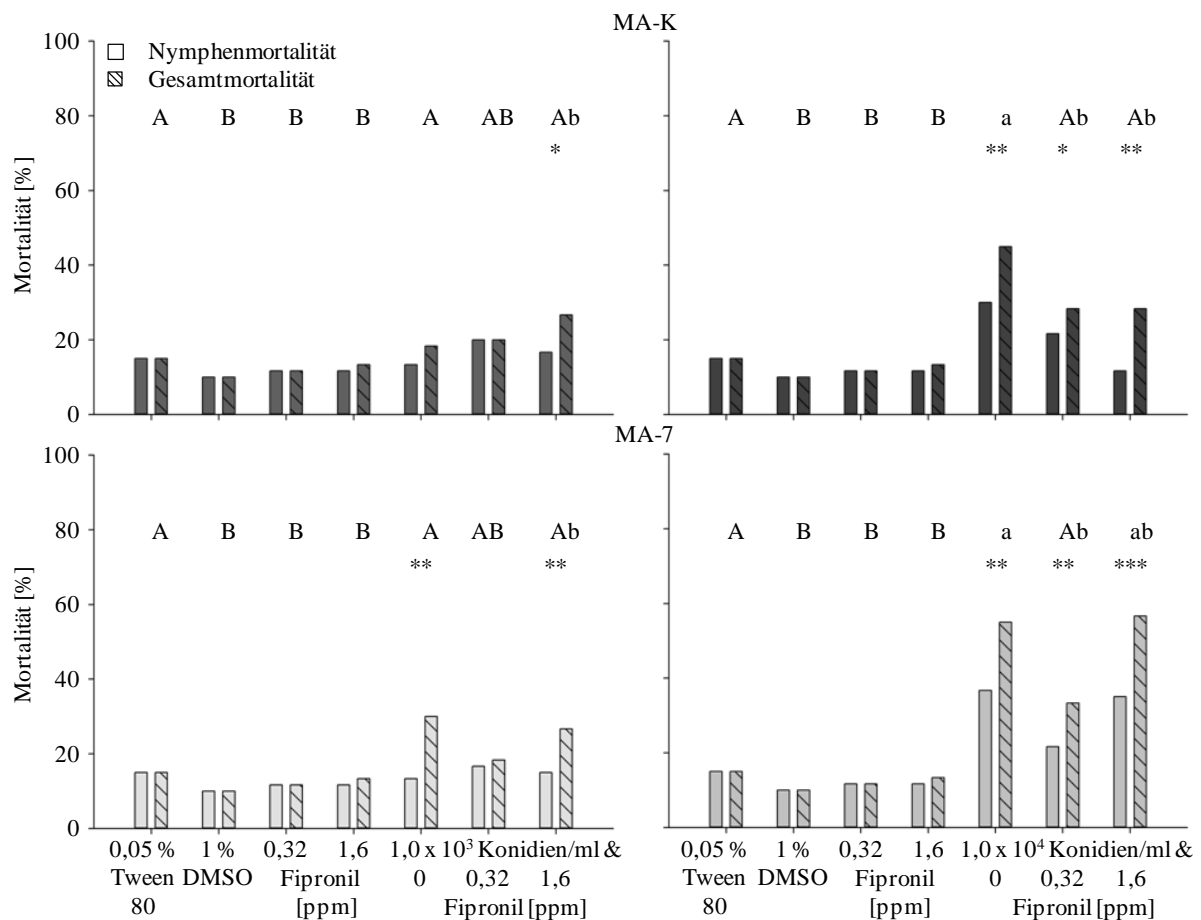


Abb. 22: Anteil der vor dem Schlupf zur Adulten gestorbenen Nymphen (Nymphenmortalität) und der Anteil der nicht geschlüpften Adulten sowie innerhalb von 14 Tagen nach dem Schlupf gestorbenen Adulten (Gesamtmortalität) von *A. hebraeum*. Die vollgesogenen Nymphen wurden mit $1,0 \times 10^3$ oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-K bzw. MA-7 und mit 0,32 oder 1,6 ppm Fipronil allein und in Kombination behandelt. Als Kontrollsubstanz diente 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen der Nymphen- und der Gesamtmortalität an (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test). Kleine Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede der Varianten zu den Kontrollen (A für Tween und B für DMSO) mit $p < 0,05$ an (χ^2 -Test) (n = 60).

MA-K und Fipronil

Sowohl $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-K als auch die beiden Kombinationen verursachten keine höhere Gesamtmortalität als die Tween-Kontrolle ($\chi^2 \leq 1,47$, $p \geq 0,23$) (Abb. 22). Nur in der Kombination von MA-K und 1,6 ppm war die Gesamtmortalität höher als in der DMSO-Kontrolle ($\chi^2 = 4,55$, $p = 0,033$). Die Chancenverhältnisse der MA-K-Fipronil-Konzentrationen waren in etwa anderthalb- bis 2,3-mal so hoch wie die der Fipronil-Konzentrationen. Die Chancenverhältnisse der Kombinationen unterschieden sich jedoch kaum von dem von MA-K allein und waren nur etwas größer als 1 (Tab. 7).

Es unterschied sich nur die Gesamtmortalität in der Behandlung mit $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml MA-K allein von der in der Tween-Kontrolle ($\chi^2 = 7,81$, $p = 0,005$). Die Kombinationen verursachten jedoch keine höhere Gesamtmortalität als 0,05 % Tween80 ($\chi^2 = 1,82$, $p = 0,18$). Die Gesamtmortalität in den Kombinationen war aber höher als die in der DMSO-Behandlung ($\chi^2 = 5,26$, $p = 0,02$). Die Chancenverhältnisse der Kombinationen mit $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml waren mehr als doppelt so hoch wie die der Fipronil-Konzentrationen, aber nur halb so hoch wie das von MA-K allein (Tab. 7).

MA-7 und Fipronil

Die Gesamtmortalität unterschied sich weder in der Behandlung mit $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-7 allein noch in den Kombinationen signifikant von der in der Tween-Kontrolle ($\chi^2 \leq 2,27$, $p \geq 0,13$) (Abb. 22) und nur die Kombination von MA-7 und 1,6 ppm verursachte eine höhere Gesamtmortalität als die Behandlung mit 1 % DMSO ($\chi^2 = 4,55$, $p = 0,033$). Die Chancenverhältnisse der Kombinationen waren in etwa anderthalb bis zweimal so hoch wie die der Fipronil-Konzentrationen. Im Vergleich mit Tween waren die Chancenverhältnisse zwar größer als 1, aber kleiner als das von MA-7 allein (Tab. 7).

Die Gesamtmortalität in den Behandlungen von $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml MA-7 und der Tween-Kontrolle unterschied sich signifikant ($\chi^2 = 12,30$, $p < 0,001$). Die Gesamtmortalität der Behandlung der Kombination aus MA-7 und 1,6 ppm Fipronil war dabei signifikant höher als die in der Tween- und DMSO-Behandlung ($\chi^2 \geq 13,89$, $p < 0,001$). MA-7 in Kombination mit 0,32 ppm verursachte eine tendenziell höhere Gesamtmortalität als Tween ($\chi^2 = 3,33$, $p = 0,068$), aber eine höhere als DMSO ($\chi^2 = 7,54$, $p = 0,006$). Beide Varianten hatten ein deutlich (drei- bis neunmal) höheres Chancenverhältnis als die Fipronil-Konzentrationen, aber nur die Kombination von $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml MA-7 und 1,6 ppm Fipronil wies auch ein leicht höheres Chancenverhältnis als das von MA-7 allein auf (Tab. 7). Die Effekte der Kombinationen von $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml mit 1,6 ppm Fipronil konnten als additiv eingestuft werden (Tab. 7).

Tab. 7: χ^2 - und p-Werte des Log-Rang-Tests (df = 1) zur Gesamtmortalität der vollgesogenen Nymphen von *A. hebraeum* und die Chancenverhältnisse (CV) der Behandlungen zu den Kontrollen. Behandelt wurden die Nymphen mit $1,0 \times 10^3$ oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-K bzw. MA-7 und mit 0,32 oder 1,6 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Zusätzlich wurde für Behandlungen, die signifikant unterschiedlich zur Kontrolle waren, eine erwartete Mortalität (M_E) und ein χ^2 -Wert ($\chi^2_{(E)}$) berechnet, um den auftretenden Effekt für die signifikanten Interaktionen in den Kombinationsvarianten zu bestimmen (n = 60).

Behandlung		Kontrolle	0,05 % Tween80			1 % DMSO			M_E	$\chi^2_{(E)}$	Effekt
			χ^2 -Wert	p-Wert	CV	χ^2 -Wert	p-Wert	CV			
Fipronil [ppm]		0,32				0,3	0,593	1,4			
		1,6				0,3	0,593	1,4			
MA-K	$1,0 \times 10^3$		0,0	0,827	1,1						
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^3$ &	0,32	0,0	0,67	1,3	2,0	0,157	2,3			
Fipronil [ppm]	$1,0 \times 10^3$ &	1,6	1,4	0,239	1,8	4,5	0,033	3,3			
	$1,0 \times 10^4$		7,8	0,005	4,1						
	$1,0 \times 10^4$ &	0,32	1,8	0,178	2,0	5,3	0,022	3,6			
	$1,0 \times 10^4$ &	1,6	1,8	0,178	2,0	5,3	0,022	3,6			
MA-7	$1,0 \times 10^3$		2,3	0,131	2,1						
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^3$ &	0,32	0,0	0,827	1,1	1,5	0,225	2,0			
Fipronil [ppm]	$1,0 \times 10^3$ &	1,6	1,4	0,239	1,8	4,5	0,033	3,3			
	$1,0 \times 10^4$		12,3	<0,001	6,1						
	$1,0 \times 10^4$ &	0,32	3,3	0,068	2,5	7,5	0,006	4,5			
	$1,0 \times 10^4$ &	1,6	13,9	<0,001	7,0	20,5	<0,001	12,6	61,0	0,0 additiv	

2.3.3.2 Ungesogene Adulte

Die beiden Versuche, die mit ungesogenen Adulten durchgeführt wurden, waren in ihren Ergebnissen so unterschiedlich, dass sie getrennt voneinander betrachtet werden mussten. Beim ersten Versuch wurden aufgrund der hohen Mortalität (90 – 100 %) keine Unterschiede zwischen den MA-K/MA-7-Fipronil-Kombinationen und MA-K bzw. MA-7 allein gefunden ($\chi^2 \leq 2,80$, $p \geq 0,09$).

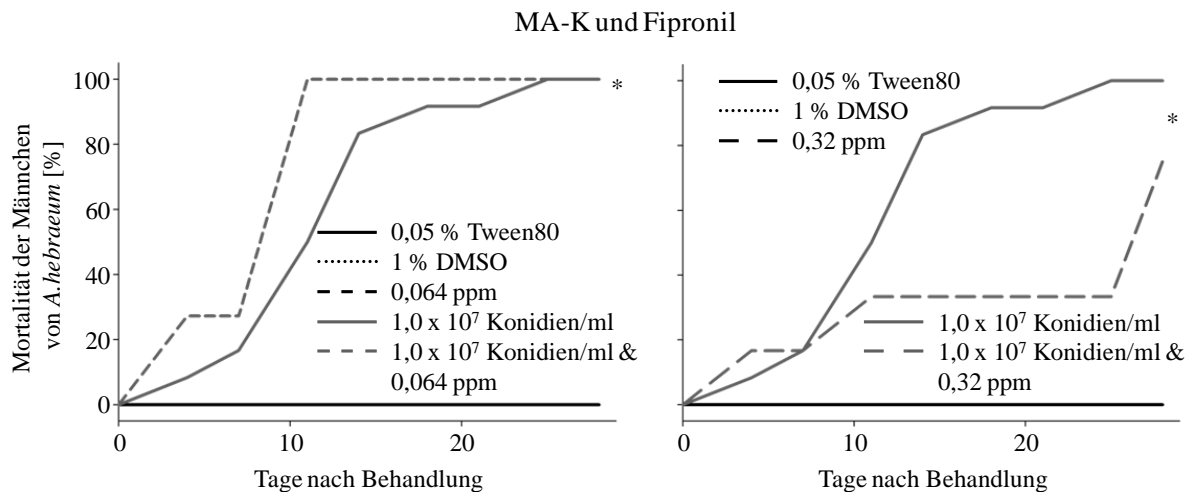


Abb. 23: Mortalität der ungesogenen Männchen von *A. hebraeum* über den Versuchszeitraum von 28 Tagen. Behandelt wurden die Männchen mit $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml von MA-K und mit 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten an (Log-Rang-Test mit $df = 1$) ($n = 12$).

Tab. 8: Erwartete Mortalität (M_E), χ^2 -Wert ($\chi^2_{(E)}$) und der auftretende Effekt der Kombinationen auf die Mortalität der ungesogenen Männchen von *A. hebraeum*. Behandelt wurden die Männchen mit $1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von MA-K bzw. MA-7 in Kombination mit 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO ($n = 12$).

Behandlung	M_E	$\chi^2_{(E)}$	Effekt
MA-K 1,0 x 10 ⁷ & 0,064	100,0	0,0	additiv
[Konidien/ml] & 1,0 x 10 ⁷ & 0,32	100,0	6,3	antagonistisch
Fipronil [ppm] 1,0 x 10 ⁸ & 0,064	-	-	-
1,0 x 10 ⁸ & 0,32	-	-	-
MA-7 1,0 x 10 ⁷ & 0,064	-	-	-
[Konidien/ml] & 1,0 x 10 ⁷ & 0,32	-	-	-
Fipronil [ppm] 1,0 x 10 ⁸ & 0,064	-	-	-
1,0 x 10 ⁸ & 0,32	-	-	-

Lediglich die Kombination von $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml MA-K in Kombination mit 0,064 ppm tötete die Männchen schneller als der Pilz allein ($\chi^2 = 5,24$, $p = 0,022$). Auf der anderen Seite verursachten die Konzentrationen von $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml MA-K in Kombination mit 0,32 ppm eine deutlich geringere Mortalität als die gleiche Konzentration von MA-K allein ($\chi^2 = 4,20$, $p = 0,04$) (Abb. 23). Die Mortalitäten in beiden Kombinationen waren aber höher als die in den Behandlungen mit 0,05 % Tween80, 1 % DMSO, 0,064 und 0,32 ppm Fipronil ($\chi^2 \geq 20,93$, $p < 0,001$). Die Effekte der Kombinationen von $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml und 0,064 ppm Fipronil wurden als additiv eingestuft, die Effekte der Kombination mit 0,32 ppm Fipronil als antagonistisch (Tab. 8).

Die Mortalitäten der Männchen und Weibchen unterschieden sich in den einzelnen Varianten im zweiten Versuch nicht signifikant voneinander ($\chi^2 \leq 3,02$, $p \geq 0,083$), dennoch werden sie im Folgenden getrennt betrachtet.

2.3.3.2.1 Männchen

Im zweiten Versuch verursachte nur 0,32 ppm Fipronil bei den ungesogenen Männchen keine Mortalität. In der Kontrollbehandlung mit 0,05 % Tween80 starben 6,6 % der Männchen vom 18. bis zum 28. Tag nach der Behandlung. In der 1 % DMSO-Kontrolle bzw. in der Variante mit 0,064 ppm starben insgesamt 13,3 % der Männchen. Die Mortalität in den Fipronil-Behandlungen unterschied sich aber nicht von der in der DMSO-Behandlung ($\chi^2 \leq 2,07$, $p \geq 0,15$).

2.3.3.2.1.1 MA-K und Fipronil

Die Behandlung mit $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml MA-K allein verursachte eine tendenziell höhere Mortalität als die Behandlung mit Tween ($\chi^2 = 3,54$, $p = 0,06$) (Abb. 24). Bei der Behandlung mit MA-K in der zuvor genannten Konzentration in Kombination mit 0,064 ppm Fipronil hingegen blieb die Anzahl der toten Männchen auf dem Niveau der Kontroll-Behandlungen ($\chi^2 \leq 0,34$, $p \geq 0,56$). Jedoch starben mehr ungesogene Männchen, wenn sie mit $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml von MA-K und 0,32 ppm Fipronil anstatt mit Tween oder DMSO behandelt wurden ($\chi^2 \geq 4,76$, $p \leq 0,03$). Das Chancenverhältnis der Kombination von $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml und 0,064 ppm war geringer als das der Einzelvarianten und lag bei maximal 1. Die Kombination mit der höheren Fipronil-Konzentration hatte hingegen ein deutlich höheres Chancenverhältnis als MA-K oder Fipronil allein. Der Effekt dieser Kombination war synergistisch (Tab. 9).

MA-K und Fipronil

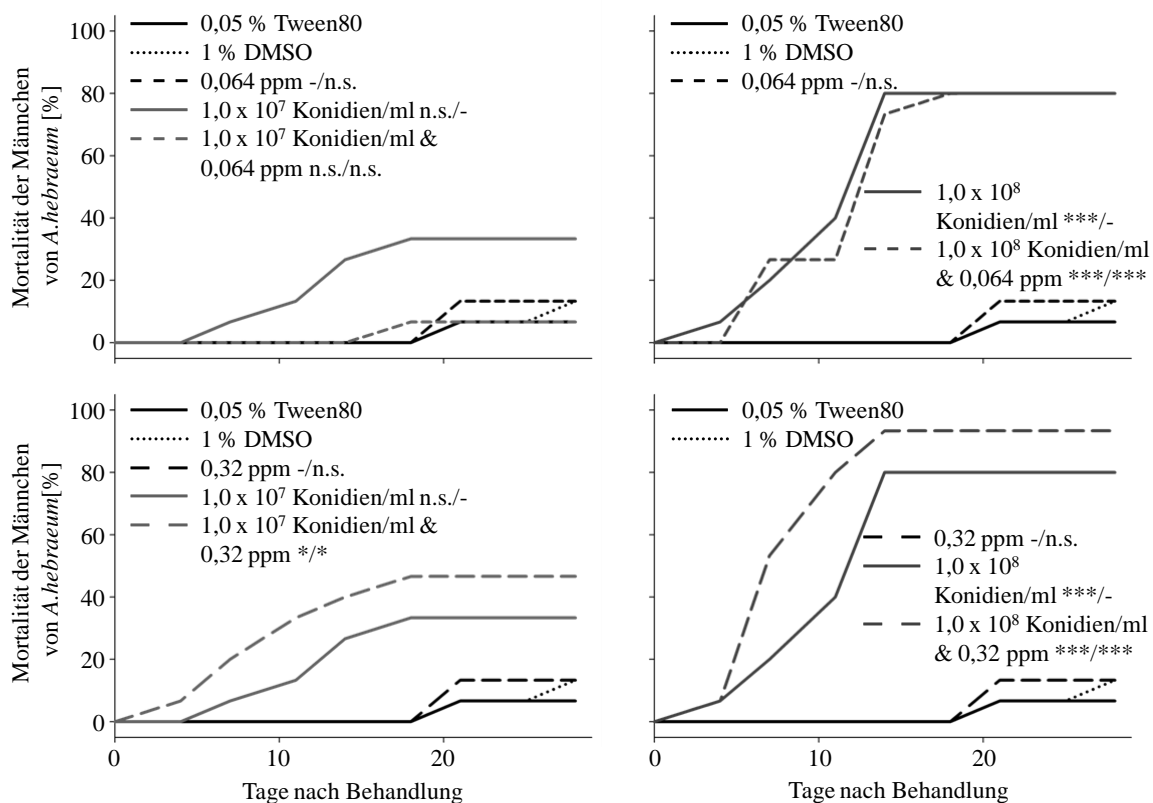


Abb. 24: Mortalität der ungesogenen Männchen von *A. hebraeum* über den Versuchszeitraum von 28 Tagen. Behandelt wurden die Männchen mit $1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von MA-K und mit 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO an (Log-Rang-Test mit $df = 1$) ($n = 15$).

Bei den Varianten mit $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml verhielt es sich ähnlich. MA-K allein sowie die Kombinationen verursachten eine höhere Mortalität als die Kontroll-Behandlungen ($\chi^2 \geq 15,8$, $p \leq 0,001$). Das Chancenverhältnis war für beide Kombinationen deutlich höher als das der Fipronil-Konzentrationen. Aber nur $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml in Kombination mit 0,32 ppm hatte auch ein deutlich höheres Chancenverhältnis als $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml MA-K allein. Beide Kombinationen mit der höheren MA-K-Konzentration wiesen additive Effekte auf (Tab. 9).

Tab. 9: χ^2 - und p-Werte des Log-Rang-Tests (df = 1) zur Mortalität ungesogener Männchen von *A. hebraeum* und die Chancenverhältnisse (CV) der Behandlungen zu den Kontrollen. Behandelt wurden die Männchen mit $1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von MA-K bzw. MA-7 und mit 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Zusätzlich wurde für Behandlungen, die signifikant unterschiedlich zur Kontrolle waren, eine erwartete Mortalität (M_E) und ein χ^2 -Wert ($\chi^2_{(E)}$) berechnet, um den auftretenden Effekt für die signifikanten Interaktionen in den Kombinationsvarianten zu bestimmen (n = 15).

Behandlung		Kontrolle	0,05 % Tween80			1 % DMSO			M_E	$\chi^2_{(E)}$	Effekt
			χ^2 -Wert	p-Wert	CV	χ^2 -Wert	p-Wert	CV			
Fipronil [ppm]		0,064				0,0	0,985	1,0			
		0,32				2,1	0,150	0,0			
MA-K	$1,0 \times 10^7$		3,5	0,061	7,0						
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^7$ &	0,064	0,0	0,981	1,0	0,3	0,577	0,5			
Fipronil [ppm]	$1,0 \times 10^7$ &	0,32	6,5	0,011	12,3	4,7	0,031	5,7	33,3	5,4 synergistisch	
	$1,0 \times 10^8$		17,3	<0,001	56,0						
	$1,0 \times 10^8$ &	0,064	17,7	<0,001	56,0	15,9	<0,001	26,0	82,7	0,1 additiv	
	$1,0 \times 10^8$ &	0,32	26,6	<0,001	196,0	25,6	<0,001	91,0	80,0	2,2 additiv	
MA-7	$1,0 \times 10^7$		1,2	0,267	3,5						
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^7$ &	0,064	0,4	0,523	2,2	0,0	0,943	1,0			
Fipronil [ppm]	$1,0 \times 10^7$ &	0,32	3,3	0,067	7,0	1,8	0,174	3,3			
	$1,0 \times 10^8$		4,8	0,029	9,3						
	$1,0 \times 10^8$ &	0,064	6,4	0,011	12,3	4,6	0,032	5,7	48,0	0,0 additiv	
	$1,0 \times 10^8$ &	0,32	15,7	<0,001	46,7	13,9	<0,001	21,7	40,0	34,0 synergistisch	

2.3.3.2.1.2 MA-7 und Fipronil

Die Varianten mit $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml von MA-7 verursachten eine ähnliche Mortalität wie 0,05 % Tween80, 1 % DMSO oder Fipronil allein ($\chi^2 \leq 3,22$, $p \geq 0,073$) (Abb. 25).

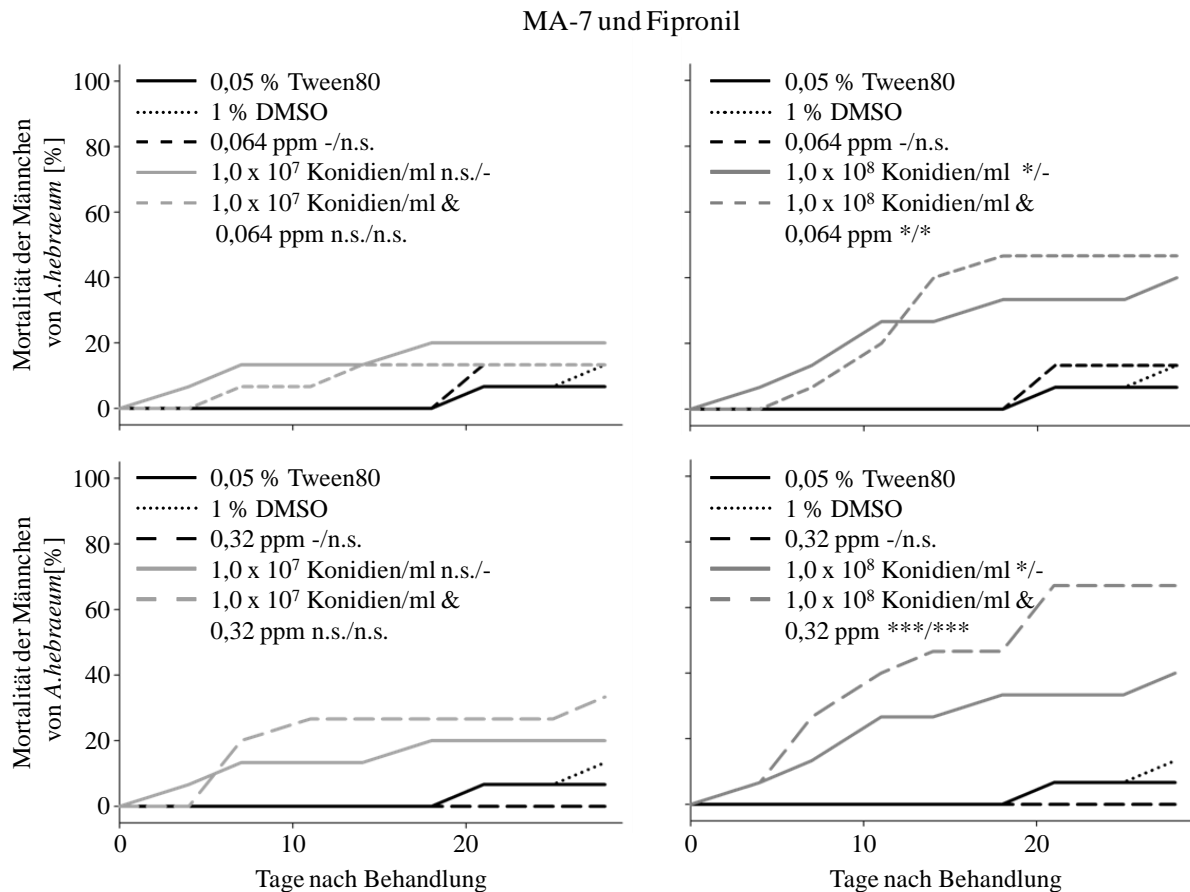


Abb. 25: Mortalität der ungesogenen Männchen von *A. hebraeum* über den Versuchszeitraum von 28 Tagen. Behandelt wurden die Adulten mit $1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von MA-7 und mit 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO an (Log-Rang-Test mit $df = 1$) ($n = 15$).

Das Chancenverhältnis der Kombination mit der geringeren Fipronil-Konzentration von 0,064 ppm war gleich dem der Fipronil-Konzentration, aber niedriger als das von MA-7 allein. Die Kombination von $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml mit 0,32 ppm wies hingegen ein höheres Chancenverhältnis sowohl gegenüber der entsprechenden Fipronil-Konzentration als auch der MA-7-Konzentration auf (Tab. 9).

Die Applikation von $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml MA-7 verursachte eine höhere Mortalität als Tween ($\chi^2 \geq 4,76$, $p \leq 0,029$). Die Mortalität in den Kombinationen war gleichfalls höher als die in der DMSO-Behandlung ($\chi^2 \geq 4,60$, $p \leq 0,03$). Die Chancenverhältnisse beider Kombinationen waren deutlich höher als die der Fipronil-Konzentrationen oder das von MA-7

allein (Tab. 9). Die Kombination mit $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml MA-7-Konzentration und 0,32 ppm Fipronil war synergistisch, während die Kombination mit der geringeren Fipronil-Konzentration additive Effekte aufwies.

2.3.3.2.2 Weibchen

Bei den Weibchen verursachte weder 0,05 % Tween80, 1 % DMSO, noch Fipronil (0,064 ppm oder 0,32 ppm) eine Mortalität.

2.3.3.2.2.1 MA-K und Fipronil

Es starben zwischen 30,0 und 36,8 % der Weibchen, wenn sie mit $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml von MA-K allein oder mit den Kombinationen behandelt wurden und damit mehr als in den Kontrollen bzw. in den Fipronil-Behandlungen ($\chi^2 \geq 6,91$, $p \leq 0,009$) (Abb. 26).

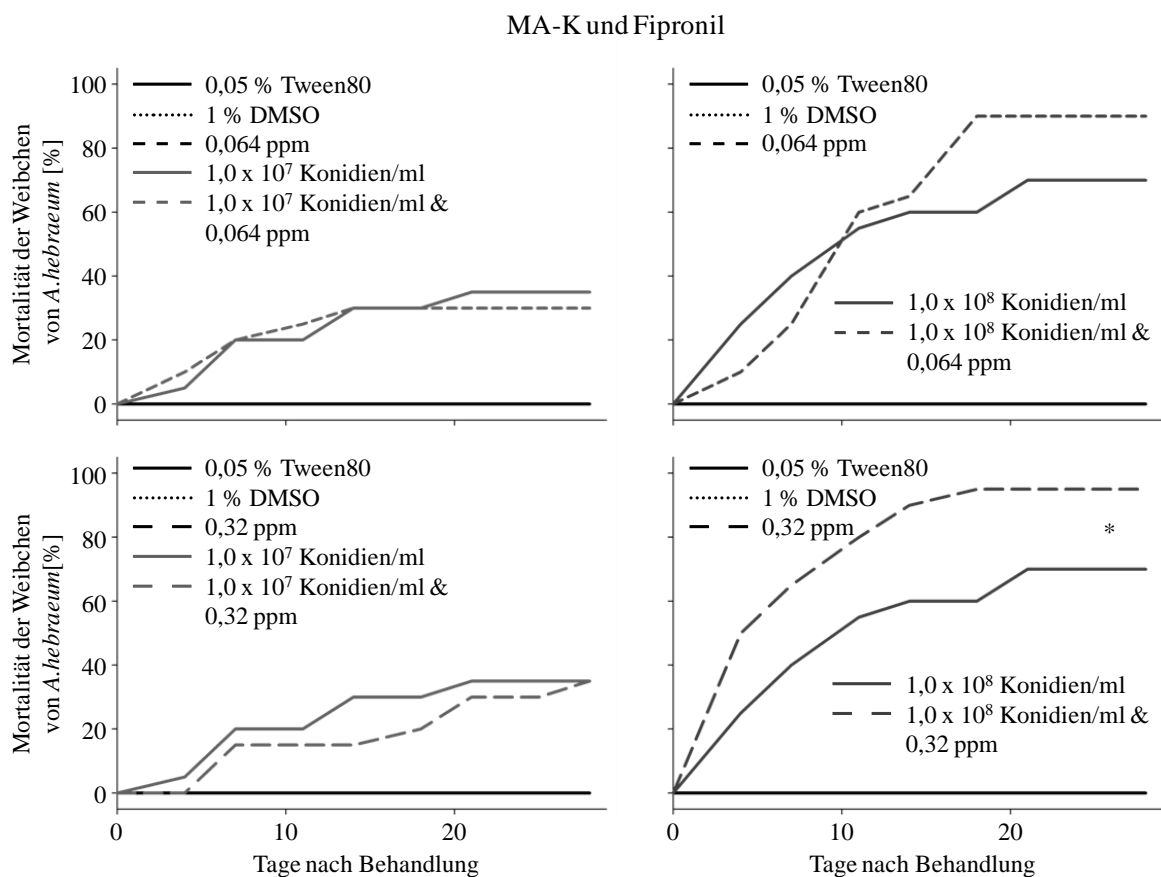


Abb. 26: Mortalität der ungesogenen Weibchen von *A. hebraeum* über den Versuchszeitraum von 28 Tagen. Behandelt wurden die Weibchen mit $1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von MA-K und mit 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten an (Log-Rang-Test mit $df = 1$) ($n=20$).

Die Mortalitäten in den Kombinationsbehandlungen und MA-K allein waren aber gleich ($\chi^2 \leq 0,16$, $p \geq 0,69$). Die Behandlung mit $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml MA-K allein oder in Kombination mit 0,064 ppm oder 0,32 ppm verursachten eine höhere Mortalität als die Tween- bzw. DMSO-Kontrolle und die Fipronil-Behandlungen ($\chi^2 \geq 25,6$, $p < 0,001$) (Abb. 26). Während die Kombination von $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml MA-K mit 0,064 ppm keine wesentlich höhere Mortalitätsrate als MA-K allein erzielen konnte ($\chi^2 = 0,67$, $p = 0,42$), war die Mortalität in der Kombination mit 0,32 ppm deutlich erhöht ($\chi^2 = 5,67$, $p = 0,017$). Besonders bemerkenswert war dabei, dass letztgenannte Variante bereits am Tag 7 eine Mortalität von 50 % erreichte, während MA-K allein erst nach fast 14 Tagen eine 50 %ige Mortalität erzielte. Die Interaktionen von $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml und 0,32 ppm waren synergistisch (Tab. 10).

2.3.3.2.2 MA-7 und Fipronil

$1,0 \times 10^7$ Konidien/ml von MA-7 konnte nicht mehr als 10 % der Tiere abtöten (Abb. 27), was keinen Unterschied zur Behandlung mit 0,05 % Tween80 darstellte ($\chi^2 = 2,16$, $p = 0,14$). Die Kombinationen von MA-7 und 0,064 ppm bzw. 0,32 ppm tötete hingegen 35 % (0,064 ppm) bzw. 40 % (0,32 ppm) der Weibchen und verursachten damit eine höhere Mortalität als Tween-, DMSO- oder die Fipronil-Behandlungen ($\chi^2 \geq 8,32$, $p \leq 0,004$). Außerdem war die Mortalität in den Kombinationen (tendenziell) höher als in der Behandlung mit MA-7 allein ($\chi^2 = 2,80$, $p = 0,094$ [0,064 ppm], $\chi^2 = 4,56$, $p = 0,033$ [0,32 ppm]). Die Interaktion von $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml MA-7 mit 0,32 ppm Fipronil war synergistisch (Tab. 10).

Die Behandlung mit $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml MA-7 allein erreichte eine höhere Mortalität der Weibchen als die Tween-Kontrolle ($\chi^2 = 13,07$, $p < 0,001$). Die Kombinationen aus $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml MA-7 und 0,064 ppm oder 0,32 ppm verursachten eine höhere Mortalität als die Tween- bzw. DMSO- oder Fipronil-Behandlungen ($\chi^2 \geq 12,20$, $p < 0,001$). MA-7 in Kombination mit 0,064 ppm oder 0,32 ppm erzielten aber ähnliche Mortalitäten wie MA-7 allein ($\chi^2 \leq 1,67$, $p \geq 0,20$).

Tab. 10: Erwartete Mortalität (M_E), χ^2 -Wert ($\chi^2_{(E)}$) und der auftretende Effekt der Kombinationen auf die Mortalität der ungesogenen Weibchen von *A. hebraeum*. Behandelt wurden die Weibchen mit $1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von MA-K bzw. MA-7 in Kombination mit 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO (n = 20).

Behandlung	M_E	$\chi^2_{(E)}$	Effekt
MA-K [Konidien/ml] & 1,0 x 10 ⁷ & 0,064 Fipronil [ppm]	-	-	-
MA-K [Konidien/ml] & 1,0 x 10 ⁷ & 0,32 Fipronil [ppm]	-	-	-
MA-K [Konidien/ml] & 1,0 x 10 ⁸ & 0,064 Fipronil [ppm]	-	-	-
MA-K [Konidien/ml] & 1,0 x 10 ⁸ & 0,32 Fipronil [ppm]	70,0	8,9	synergistisch
MA-7 [Konidien/ml] & 1,0 x 10 ⁷ & 0,064 Fipronil [ppm]	-	-	-
MA-7 [Konidien/ml] & 1,0 x 10 ⁷ & 0,32 Fipronil [ppm]	10,0	90,0	synergistisch
MA-7 [Konidien/ml] & 1,0 x 10 ⁸ & 0,064 Fipronil [ppm]	-	-	-
MA-7 [Konidien/ml] & 1,0 x 10 ⁸ & 0,32 Fipronil [ppm]	-	-	-

MA-7 und Fipronil

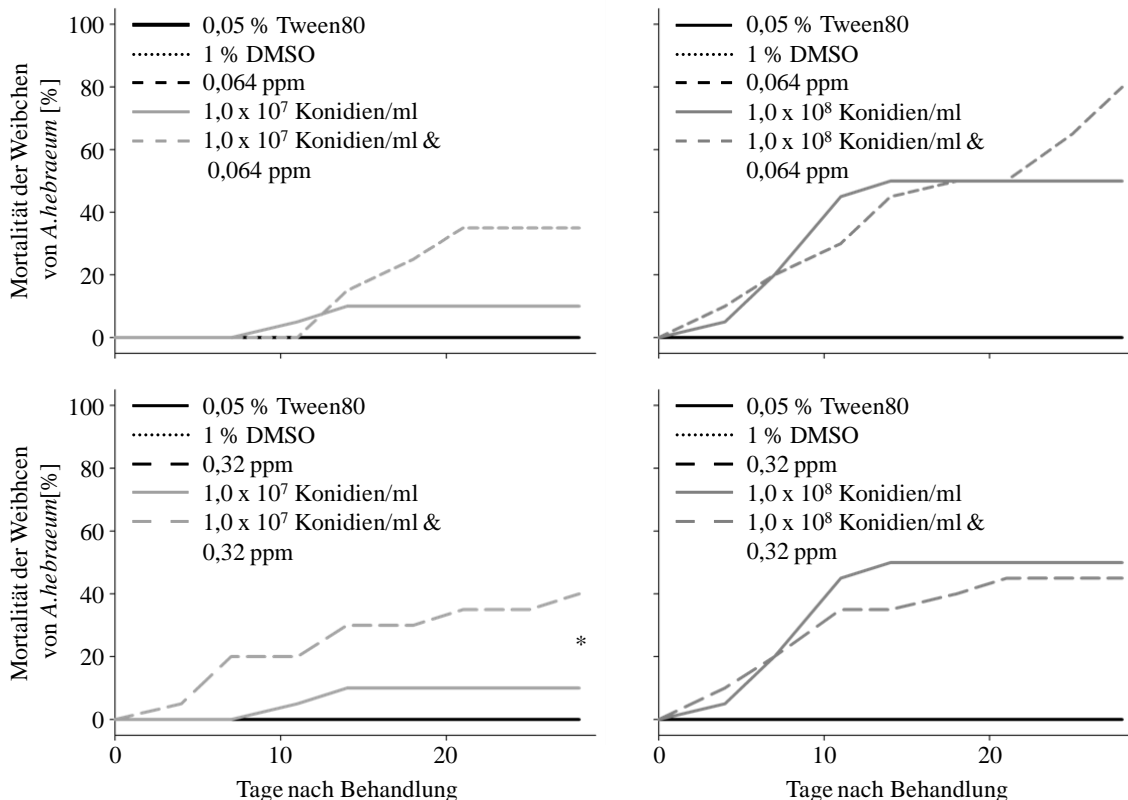


Abb. 27: Mortalität der ungesogenen Weibchen von *A. hebraeum* über den Versuchszeitraum von 28 Tagen. Behandelt wurden die Weibchen mit $1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von MA-7 und mit 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten an (Log-Rang-Test mit $df = 1$) (n = 20).

2.4 Diskussion

Die Kontrolle von *A. hebraeum* ist aufgrund der von ihr hervorgerufenen gravierenden Wunden und der von ihr übertragenen Krankheitserreger (Khan 2010, Norval 1977a) notwendig. Es ist allerdings aus verschiedenen Gründen (u. a. Kosten [Moyo und Masika 2009]) erstrebenswert, die dafür aufgewendete Ektoparasitizidmenge zu minimieren. Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit Kombinationen von *M. anisopliae* und niedriger Konzentrationen synthetischer Schädlingsbekämpfungsmittel untersucht. Es war dafür zunächst notwendig, die subletalen Konzentrationen der Schädlingsbekämpfungsmittel (Etoxazol und Fipronil) und niedrige Wirkungsgrade der beiden Stämme von *M. anisopliae* (MA-K und MA-7) zu ermitteln, um diese anschließend gemeinsam anzuwenden. Im Folgenden wird daher zunächst auf die Ergebnisse der Dosis-Wirkungs-Versuche von Etoxazol, Fipronil, MA-K und MA-7 eingegangen. Anschließend werden die Wirkungen der Kombinationen vor dem Hintergrund anderer Studien diskutiert.

2.4.1 Subletale Konzentrationen von Etoxazol und Fipronil

Etoxazol erreichte bereits in sehr niedrigen Konzentrationen von 0,032 ppm (~ 0,032 µg/ml) eine Mortalität von fast 50 % und bei 0,16 ppm (~ 0,16 µg/ml) sogar eine 100 %ige Mortalität und es ließ sich ein LC₅₀-Wert von 0,037 ppm ermitteln. Auch Tamura *et al.* (2004) konnten bereits mit sehr geringem Einsatz von Etoxazol eine hohe Wirkung auf Zecken erzielen. So wurden 100 % der vollgesogenen Nymphen von *Haemaphysalis longicornis* am Schlüpfen gehindert, wenn sie entweder für 3,5 Stunden mit 0,1 µg/cm² oder für 0,5 Stunden mit 1,0 µg/cm² behandelt wurden. Da Etoxazol neben der Wirkung auf Zecken auch noch den Vorteil einer geringen Säugertoxizität hat und in der Umwelt schnell abgebaut wird (Dekeyser 2005), scheint es für die Anwendung an sich häutenden Zeckenstadien gut geeignet zu sein. Da der Wirkmechanismus von Etoxazol in der Hemmung des Häutungsprozesses (Suzuki *et al.* 2001) vermutet wird, ist es für eine Kontrolle von ungesogenen Stadien aber nicht geeignet. Dafür bietet sich Fipronil an, das eine schnelle Kontakt- und eine langanhaltende Residualwirkung besitzt (Blagburn und Lindsay 2001, Wiedemann 2000, Postal *et al.* 1995) und für Vertebraten weitestgehend ungefährlich ist (Ungemach 2010, Kunkle 1997). Fipronil wirkte in den vorliegenden Versuchen auch auf Nymphen, auch wenn zum Erreichen einer 50 %igen Mortalität 2,06 ppm Fipronil eingesetzt werden mussten. Bei den Adulten wurde eine relativ hohe Dosierung (LC₅₀-Wert von 5,6 bzw. 7,5 ppm) benötigt, um 50 % der Tiere innerhalb von 14 Tagen abzutöten. Da in anderen Studien nicht zwischen Männchen und Weibchen unterschieden wurde (z. B. Dryden *et al.* 2006b) oder nur die Empfindlichkeit der

Weibchen untersucht wurde (z. B. Estrada-Peña und Rème 2005), kann keine Aussage getroffen werden, ob es auch bei anderen Schädlingsbekämpfungsmitteln keine Unterschiede bezüglich der geschlechtsspezifischen Empfindlichkeit gibt. Ein Vergleich der Nymphen-ergebnisse mit anderen Arbeiten ist schwierig, da es überwiegend Studien über ungesogene Stadien und Adulte gibt. In einem Test mit vier verschiedenen Schädlingsbekämpfungsmitteln reagierten aber, zum Beispiel, die gesogenen Nymphen von *Amblyomma variegatum* empfindlicher als die ungesogenen (Natala *et al.* 2005). Grundsätzlich scheint die Empfindlichkeit von Stadium zu Stadium abzunehmen, wie Koch und Burkwhat (1984) in einer Studie mit den verschiedenen Stadien von *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor variabilis* und *Amblyomma americanum* und vier Schädlingsbekämpfungsmitteln ermitteln konnten, was mit den hier gefundenen Ergebnissen über Fipronil im Einklang steht. Sicherlich ist die Wirkung von Schädlingsbekämpfungsmitteln auch vom Alter der Zecke abhängig; so fand Mount (1984), dass alle Stadien von *A. americanum* unter Laborbedingungen mit zunehmendem Alter empfindlicher auf Schädlingsbekämpfungsmittel reagierten. Da Fipronil in vielen Gebieten, in denen Studien zur Wirkung der Schädlingsbekämpfungsmittel durchgeführt wurden, nicht für die Zeckenbekämpfung an Nutztieren zugelassen ist (z. B. Burrige *et al.* 2003), liegen nur wenige Studien mit *Amblyomma*-Arten vor, die Fipronil einschließen. Gegen die Schildkrötenzecke *Amblyomma marmoratum* wirkt Fipronil beispielsweise. Allerdings wurde für eine 80 %ige Mortalität 24 Stunden nach Behandlung der getesteten Zecken eine Aufwandmenge von 0,097 % (~ 970 ppm) Fipronil benötigt und der berechnete LC₅₀-Wert nach 24 Stunden betrug 0,096 % (0,062 % – 0,14 %) (~ 960 ppm) (Burrige *et al.* 2002). Auch in anderen Studien, in denen Fipronil untersucht wurde, zeichnete sich ab, dass Fipronil zwar wirksam ist, aber meist eine geringere Effektivität als andere Schädlingsbekämpfungsmittel aufweist (Endris *et al.* 2000). Eingesetzt wird Fipronil beispielsweise im Hygienebereich an Kleintieren. Für die Anwendung an Hunden und Katzen kommt ein Kombinationspräparat zur Anwendung, das aus Fipronil und S-Methropen besteht. S-Methropen ist ein Wachstumsregulator (IRAC Gruppe 7), dem Juvenilhormon sehr ähnlich und unterbricht die Metamorphose (Ungemach 2010, White und Whitacre 2004). Da S-Methropen nur auf Eier und Larvenstadien wirkt, kann davon ausgegangen werden, dass bei den im Folgenden angesprochenen Untersuchungen mit dem Kombinationspräparat bei der Anwendung gegen adulte Zecken die Wirkung allein dem Wirkstoff Fipronil zuzuschreiben ist. Im Vergleich einer Auftropf-Formulierung von Fipronil (9,8 %) und S-Methropen (8,8 %) mit einem mit Amitraz behandelten Halsband war Fipronil zwar effektiv, Amitraz wirkte aber besser, was allerdings an der unterschiedlichen Anwendungsart gelegen haben könnte. Die

Anwendung mit Fipronil konnte im Gegensatz zu Amitraz nicht verhindern, dass ein Teil der Adulten von *R. sanguineus* noch Blut aufnahmen, bevor sie starben (Estrada-Peña und Ascher 1999). Dryden *et al.* (2006a, 2006b, 2008) führten eine Reihe von Versuchen mit unterschiedlichen Zeckenarten zur Wirksamkeit einer Fipronil (9,8 % w/w)-(S)-Methropen (8,8 % w/w)- Kombination und einer Permethrin (44 % w/w)-Imidacloprid (8,8 % w/w)-Kombination an Hunden durch. Fipronil-(S)-Methropen hatte in diesen Versuchen im Gegensatz zu dem Permethrin-Imidacloprid-Gemisch keinen Repellenzeffekt. Auch wenn der Wirkungseintritt langsamer als beim Permethrin-Gemisch war, wirkte Fipronil dennoch gut über den gesamten Versuchszeitraum. 28 Tage nach der Applikation starben immer noch 86,3 % der 48 Stunden vorher aufgesetzten Adulten von *R. sanguineus*, 83,23 % von *D. variabilis*, 64,4 % von *A. americanum* und sogar 98,4 % von *Ixodes scapularis* (Dryden *et al.* 2006a, Dryden *et al.* 2006b). Es ist aufgrund unterschiedlicher Methoden und Zeckenarten aber schwierig, die Ergebnisse aussagekräftig mit den hier vorliegenden zu vergleichen.

Ein wesentlicher Unterschied zu den meisten Studien liegt jedoch im Wirkungseintritt. Während in der Literatur häufig von einem schnellen Wirkungseintritt die Rede ist (innerhalb von 48 Stunden) (Dryden *et al.* 2008, Dryden *et al.* 2006b, Burridge *et al.* 2002, Cruthers *et al.* 2001), konnte dieser in den hier durchgeführten Dosis-Wirkungs-Versuchen nicht beobachtet werden. Die Ergebnisse sind jedoch mit Vorsicht zu betrachten, da der Versuch mit den Adulten nicht wiederholt werden konnte.

2.4.2 Konzentrationsabhängige Wirkungsgrade von MA-K und MA-7

Beide *M. anisopliae*-Stämme zeigten eine gute Wirkung auf die gesogenen Nymphen und konnten mit etwas über $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml bereits 50 % der Nymphen töten. Hierbei ist hervorzuheben, dass der Pilz, auch wenn er den Schlupf der Nympe zur Adulten nicht verhindern konnte, innerhalb von wenigen Tagen nach dem Schlupf die Adulten abtöten kann. Samish *et al.* (2001) berichten ähnliches über MA-7 und andere *M. anisopliae*-Stämme in Bezug auf frischgeschlüpfte Adulte von *R. sanguineus*. Um 50 % der Adulten von *A. hebraeum* abzutöten ist eine 100- bis 10000-fach höhere Menge erforderlich (zwischen $1,0 \times 10^6$ und $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml), wobei Weibchen weniger empfindlich reagierten als Männchen. Auch für dieses Ergebnis ist aufgrund der geringen Anzahl an Versuchstieren und der fehlenden Versuchswiederholungen eine vorsichtige Betrachtung geboten. Zur unterschiedlichen Empfindlichkeit der Geschlechter finden sich in der Literatur sowohl Hinweise, dass Männchen tendenziell empfindlicher auf *M. anisopliae* reagieren als Weibchen (Gindin *et al.* 2002, Samish *et al.* 2001) als auch, dass es keine Unterschiede gibt

(Kirkland *et al.* 2004b, Reis *et al.* 2001). Dass die Empfindlichkeit gegenüber entomopathogenen Pilzen von Stadium zu Stadium abnimmt und dass vollgesogene Stadien empfindlicher reagieren als ungesogene, wurde auch in anderen Studien ermittelt. Samish *et al.* (2001) untersuchten die Empfindlichkeit verschiedener Stadien von *R. sanguineus*. Es starben 14 Tage nach Erstkontakt mit $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml ($2,5 \times 10^3$ Konidien/mm²) von MA-7 auf getränktem Filterpapier 75,5 % der behandelten ungesogenen und 57,5 % der vollgesogenen Nymphen. Hingegen starben nur 32,5 % der ungesogenen Weibchen und 56,6 % der Männchen 21 Tage, nachdem sie in einem Tauchbad mit $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml behandelt wurden. Und auch für *Hyalomma excavatum* zeigte sich, dass gesogene Nymphen empfindlicher reagieren als ungesogene (Gindin *et al.* 2002). Auch zu *Amblyomma*-Arten gibt es entsprechende Studien allerdings unter Verwendung anderer Pilzstämmen. So starben $37 \pm 3,5$ % der Weibchen von *A. variegatum*, wenn sie während des Saugens an einem Kaninchen mit *M. anisopliae* (5 ml von 10^8 Konidien/ml) behandelt wurden. Außerdem war die Gewichtszunahme (die Menge des aufgenommenen Blutes) behandelter Zecken im Vergleich zur Kontrolle geringer, ebenso die abgelegte Eimenge behandelter Weibchen und die Schlupfrate der Larven (Kaaya *et al.* 1996). Auch Kaaya und Hassan (2000), die die verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. variegatum* nach dem Tauchen in einer Konidien suspension ($1,0 \times 10^9$ Konidien/ml) von *M. anisopliae* oder *Beauveria bassiana* in einem Gras-Mikrokosmos inkubierten, fanden, dass Larven am empfindlichsten auf die beiden entomopathogenen Pilzstämmen reagierten, gefolgt von Nymphen und Adulten. Kirkland *et al.* (2004a) beobachteten, dass *Amblyomma maculatum* deutlich empfindlicher auf Behandlungen mit $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von *M. anisopliae* (ATCC 20500) oder *B. bassiana* (ATCC 90517) reagierte als *A. americanum* (60 – 100 % Mortalität bei *A. maculatum* und 10 – 35 % Mortalität bei *A. americanum*). Außerdem reagierten Nymphen beider Arten empfindlicher als die Adulten. Souza *et al.* (1999) ermittelten für drei verschiedene Stämme von *M. anisopliae* (959, 319 und E9) LC₅₀-Werte zwischen $3,2 \times 10^7$ und $1,1 \times 10^8$ Konidien/ml für Eier und LC₅₀-Werte von $1,8 \times 10^5$ bis $6,5 \times 10^5$ Konidien/ml für Larven von *Amblyomma cajennense*. Aus den Ergebnissen dieser Studien lässt sich ableiten, dass die Zeckenart und ihr Stadium eine ebenso wichtige Rolle bei der Bestimmung der Empfindlichkeit gegenüber einem entomopathogenen Pilzstamm spielt wie der Pilzstamm selbst.

2.4.3 Kombinationen aus *M. anisopliae* und Etoxazol oder Fipronil

2.4.3.1 Wirkungen der Kombinationen auf Nymphen

2.4.3.1.1 Etoxazol

In den vorliegenden Kombinationsstudien wurde davon ausgegangen (Arbeitshypothese), dass Etoxazol bzw. Fipronil in den eingesetzten subletalen Konzentrationen als Stressoren wirkten und dadurch die Virulenz von *M. anisopliae* erhöhten. Hinsichtlich der Mortalität brachten die Kombinationen von *M. anisopliae* mit Etoxazol bei der Mortalität der Nymphen keine eindeutigen Ergebnisse, erst bei der Mortalität der frischgeschlüpften Adulten wurde der stimulierende Effekt deutlich. Die erhöhte Mortalität der frischgeschlüpften Adulten ist teils durch die höhere Empfindlichkeit dieses Stadiums gegenüber *M. anisopliae* zu erklären (Samish *et al.* 2001); möglich erscheint es aber auch, dass der Pilz nach der Häutung durch die Wirkung von Etoxazol leichter in die Adulten eindringen kann.

Hassan und Charnley (1989) konnten zeigen, dass die Kutikula von Larven von *Manduca sexta*, die mit Dimilin (ein Chitin-Biosynthese-Inhibitor) behandelt wurden, für *M. anisopliae* keine Barriere mehr darstellte. Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Kutikula nach Applikation von *M. anisopliae* zeigte, dass die Struktur der Prokutikula der Larven, die mit Dimilin behandelt wurden, im innen liegenden Teil, der während der Behandlung mit Dimilin ausgebildet wurde, fehlgebildet war und es an Struktur und Festigkeit fehlte. Die fehlgebildete Prokutikula wies keine Schutzfunktion gegenüber *M. anisopliae* auf. Bei einer intakten Kutikula stellt Chitin eine physische Barriere für *M. anisopliae* dar, da nachgewiesen wurde, dass keine Chitinasen zum Abbau des Chitins während der ersten 40 Stunden der Infektion (Untersuchungen an *Calliphora vomitoria* und *M. sexta*) durch den Pilz gebildet werden. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass die Chitinasen in der initialen Eindringphase in die Kutikula keine Rolle spielen. Gebildet werden in dieser Phase vor allem Proteasen und Aminopeptidasen, die die Protein-/Peptidbestandteile der Kutikula hydrolysieren (St. Leger *et al.* 1986). Chitin ist *in vitro* aber auch in der Lage, über Ionenbindungen Proteasen zu binden und so die Proteolyse zu verhindern (St Leger *et al.* 1986). Fehlt Chitin jedoch in der Kutikula, kann die gesamte Kutikula hydrolysiert werden (Hassan und Charnley 1989). Sofern dieser Effekt auch durch Etoxazol-Behandlungen erzeugt wird, würde dieses die deutlich erhöhte Mortalität der frischgeschlüpften Adulten in den Kombinationen erklären. Die Effekte der Kombinationen aus MA-K bzw. MA-7 mit 0,0064 ppm Etoxazol waren additiv, während bei allen Kombinationen von MA-K bzw. MA-7 mit der höheren Etoxazol-Konzentration (0,032 ppm) ein antagonistischer Effekt beobachtet wurde. Eine Ausnahme davon bildete nur die Kombination aus $1,0 \times 10^3$

Konidien/ml MA-7 und 0,032 ppm Etoxazol, bei der die Mortalität nicht unterschiedlich zu der in den Kontrollen war. Da es zu Etoxazol bislang keine Literatur zu kombinierter Anwendung gibt, Nauen und Smagghe (2006) aber davon ausgehen, dass Etoxazol zumindest in Blattläusen und Milben einen ähnlichen biochemischen Pfad wie Benzoylphenylharnstoff-Insektizide beeinflusst, werden hier im Folgenden Kombinationsversuche mit verschiedenen Benzoylphenylharnstoffen zum Vergleich herangezogen.

Ähnliche antagonistische Effekte wurden mit Triflumuron gefunden. In Kombination mit *B. bassiana* war die Eimortalität der Milbe *Tetranychus urticae* geringer als die Mortalität durch *B. bassiana* allein (Sáenz-de-Cabezón Irigaray *et al.* 2003). Ähnlich wie bei den Kompatibilitätsstudien mit Etoxazol, hatte Triflumuron keinen negativen Einfluss auf die Keimrate, beeinflusste allerdings das vegetative Wachstum negativ. Daher gehen Sáenz-de-Cabezón Irigaray *et al.* (2003) davon aus, dass die Reduktion des vegetativen Wachstums für die geringere Mortalität in der Kombination verantwortlich sein könnte. Es gab aber auch in einigen Studien additive Effekte durch Kombinationen mit Chitin-Synthese-Inhibitoren. So konnten Delgado *et al.* (1999) durch Kombination von *B. bassiana* und Diflubenzuron additive Effekte gegen Heuschrecken erzielen. Und Anderson *et al.* (1989) fanden bei ihren Versuchen zur Kontrolle von *Leptinotarsa decemlineata*, dass die Mortalität in der Behandlung mit einer Kombination aus *B. bassiana* und Triflumuron tendenziell höher war als die in der Behandlung mit *B. bassiana* allein. Auch für *M. anisopliae* zeigte sich, dass die Kombinationen mit verschiedenen Chitin-Synthese-Inhibitoren (Teflubenzuron, Chlorfluazuron, Flufenoxuron) *in vitro* eine höhere Mortalität der Larven von *Anomala cuprea* verursachte (Hiromori und Nishigaki 1998).

Für eine erfolgreiche Anwendung von Etoxazol scheint es sehr auf die Konzentration anzukommen. Selbst Konzentrationen, die in den Kompatibilitätsstudien eine vollständige Kompatibilität ergeben hatten, beeinflussten den Pilz in der Kombination negativ. Die Keimrate und das vegetative Wachstum wurden bis 4 ppm von Etoxazol nicht beeinträchtigt (siehe Kapitel 1). Lediglich die Konidienbildung wurde vor allem bei MA-7 stärker beeinträchtigt; dieses ist aber im Gegensatz zu den genannten Parametern für die Initialisierung der Infektion nicht entscheidend. Alves *et al.* (1998) gehen davon aus, dass *in vitro* Ergebnisse zur der Kompatibilität auch *in vivo* relevant sind. Mietkiewski *et al.* (1997) fanden allerdings bei einigen Schädlingsbekämpfungsmitteln, dass sich *in vivo* Effekte deutlich von *in vitro* Ergebnissen unterscheiden können. Die Behinderung des *M. anisopliae*-Stammes durch das Schädlingsbekämpfungsmittel mag dadurch zu Stande gekommen sein, dass dem Pilz auf der Zecke im Gegensatz zum Nährmedium nicht alle für Keimung und Wachstum

notwendigen Nährstoffe ausreichend zur Verfügung standen (Bidochka und Khachatourians 1992, Campbell *et al.* 1983, Barnes *et al.* 1975). Auch wenn bei Kompatibilitätsstudien mit Benzoylphenylharnstoff keine negativen Effekte auf *B. bassiana* gefunden wurden (Tamai *et al.* 2002, Anderson *et al.* 1989), könnte es sein, dass die *M. anisopliae*-Stämme in Studien an Zecken auf Etoxazol empfindlicher reagierten als sie es bei optimaler Nährstoffversorgung täten. Dadurch würden eventuelle Vorteile einer herabgesetzten Immunantwort im negativen Sinne kompensiert. Gegebenfalls können aber auch negative Auswirkungen der Schädlingsbekämpfungsmittel bei höheren Konzentrationen von *M. anisopliae*, z. B. $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml, wie sie beim Kompatibilitätsversuch (siehe Kapitel 1) benutzt wurden, leichter ausgeglichen werden, da bei diesen noch genügend lebensfähige Konidien vorhanden sind. Für Kombinationsversuche werden normalerweise höhere Konzentrationen als die hier vorliegenden benutzt (zwischen $1,0 \times 10^7$ und $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml) (z. B. Hiromori und Nishigaki 1998, Anderson *et al.* 1989, Hassan und Charnley 1989). In den vorliegenden Versuchen wurde aber gezielt mit möglichst geringen Konzentrationen ($\sim LC_{50}$) gearbeitet, bei denen es möglich ist, einen Effekt der Schädlingsbekämpfungsmittel festzustellen. Bei dieser vergleichsweise geringeren Anzahl von $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml reichten die vorhandenen lebensfähigen Konidien unter Umständen nicht mehr aus, um eine Infektion zu initiieren, selbst wenn das Immunsystem des Wirtes durch das Schädlingsbekämpfungsmittel beeinträchtigt würde.

2.4.3.1.2 Fipronil

Bei den Kombinationsversuchen mit Fipronil blieben die Mortalitäten in allen MA-K- und MA-7-Varianten mit Konzentrationen von $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml auf dem Niveau der Kontrollen. In der Behandlung mit der höheren Konzentration von $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml war die Mortalität durch *M. anisopliae* allein besser als in den Kombinationen. Eine Ausnahme bildete nur $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-7 in Kombination mit 1,6 ppm Fipronil, die ähnliche Mortalitätsraten wie MA-7 allein erreichte. Allerdings handelte es sich hier nur um einen additiven Effekt. Studien mit anderen GABAergen Chloridkanal-Antagonisten zeigten sowohl synergistische als auch leicht antagonistische Effekte. Dayakar *et al.* (2001) fanden synergistische Effekte bei der kombinierten Anwendung von Endosulfan und *B. bassiana* bzw. *M. anisopliae* gegen *Spodoptera litura*. Die Virulenz von *M. anisopliae* konnte dabei in Kombination mit Endosulfan um das 1,24-fache gesteigert werden. In einem anderen Versuch zur Kontrolle von *Spilarctia obliqua* mit kombiniertem Einsatz von Endosulfan mit *B. bassiana* oder *M. anisopliae* wurde aber durch die Kombination keine Steigerung der

Mortalität beobachtet (Purwar und Sachan 2006). Die Schädlingsbekämpfungsmittel-empfindlichkeit von *M. anisopliae* kann stark stammspezifisch sein (Olmert und Kenneth 1974), so dass sich Literaturdaten nicht einfach auf die hier untersuchten Stämme übertragen lassen.

Bei der vergleichsweise geringeren Anzahl von $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml reichen, wie für Etoxazol diskutiert, die vorhandenen lebensfähigen Konidien unter Umständen nicht mehr aus, dem Pilz die Infektion des Wirtes zu ermöglichen und eine signifikante pilzinduzierte Mortalität hervorzurufen. Erschwerend für eine eindeutige Bewertung der Kombinationen ist die offensichtlich selbst unter konstanten Bedingungen von Versuch zu Versuch variierende Effizienz des Pilzes. Einerseits wurden mit Konzentrationen von $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml deutliche Wirkungen erzielt, andererseits wurde mit derselben Konzentration aber die Kontrollmortalität nicht überschritten. Diese Variabilität gab es auch beim Versuch mit den Adulten. Dort erreichten die als subletal ermittelten Pilzkonzentrationen zum Teil eine 100 %ige Mortalität, wodurch eine mögliche Interaktion von Fipronil mit *M. anisopliae* nicht mehr erkannt werden konnte. Der Effekt der Kombination von $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml mit 0,32 ppm Fipronil bei den Männchen wurde im ersten Versuch als antagonistisch eingestuft, im zweiten Versuch als synergistisch. Während MA-7 allein im ersten Versuch fast 100 % Mortalität erreichte, verursachte MA-7 im zweiten Versuch nur eine Mortalität auf Kontrollniveau (circa 20 %).

2.4.3.1.3 Schlupf der Nymphen zu Adulten

Nach Behandlung der vollgesogenen Nymphen wurde für Fipronil und Etoxazol die Schlupfrate nach 63 Tagen bestimmt, während bei Behandlungen mit *M. anisopliae* über einen Zeitraum von 63 Tagen die Mortalität und zusätzlich die Schlupfrate bestimmt wurden. Der beobachtete Schlupfzeitraum von der Nympe zur Adulten war nicht ungewöhnlich, auch wenn die Entwicklungsdauer von Nutall (1915) mit 18 bis 21 Tage angegeben wurde. Da dieser die Nymphen aber bei 30 °C hielt, in den vorliegenden Versuchen aber nur eine Temperatur von 23 °C vorlag und die Zeitspanne bis zur Häutung mit sinkender Temperatur zunimmt (Sonenshine 1991), kommt die Schlupfdauer eher an die von Arthur (1962) und Lounsbury (1899) beobachtete heran. Es hatten im Prinzip weder eine Kontrollsubstanz noch Etoxazol/Fipronil oder die *M. anisopliae*-Stämme (allein oder in Kombination) einen Einfluss auf die Dauer bis zum Schlupf der Nympe zur Adulten. Vereinzelt wird berichtet, dass sich die Entwicklungszeit und Schlupfdauer von Eiern nach Behandlung mit *M. anisopliae* verlängern (Polar *et al.* 2005). Es gibt aber auch Versuche, in denen kein Unterschied

zwischen den Behandlungen mit *M. anisopliae* oder *B. bassiana* und den Kontrollbehandlungen bezüglich der Eierentwicklungszeit und -schlupfzeit u. a. von *A. cajennense* und *Rhipicephalus microplus* gefunden wurde (Fernandes *et al.* 2004, Souza *et al.* 1999). Bei Versuchen mit vollgesogenen Larven und Nymphen werden häufig keine Angaben gemacht, ob sich die Zeit bis zum Schlupf bzw. die Schlupfdauer verlängert (Prette *et al.* 2005, Reis *et al.* 2001, Samish *et al.* 2001, Barbosa *et al.* 1997), was darauf schließen lässt, dass die getesteten *M. anisopliae* und *B. bassiana*-Stämme keinen Einfluss darauf haben, wie es auch in den vorliegenden Versuchen bei *A. hebraeum* der Fall war. Über eine Verlängerung des Zeitraumes bis zum Schlupf durch Schädlingsbekämpfungsmittel findet sich in der Literatur ebenfalls kein Hinweis. Da aber die Häutung durch Hormone gesteuert wird (Sonenshine 1991) und weder Etoxazol noch Fipronil in den Hormonhaushalt eingreifen, ist nicht davon auszugehen, dass sie einen Einfluss auf die Schlupfzeit haben.

2.4.3.2 Wirkungen der Kombinationen auf Adulte

Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geschlechtern bei Anwendung der Kombinationen. Da weder Fipronil noch MA-K bzw. MA-7 in den Versuchen zur Ermittlung der subletalen Konzentrationen Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen zeigten, war dieses in den Kombinationen auch nicht zu erwarten.

Bei den Weibchen erzielte die Kombination von $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von MA-K mit 0,32 ppm eine schnellere und höhere Mortalität als MA-K allein, bei den Männchen konnte dieses zusätzlich bei Behandlung mit der Kombination aus $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml MA-K und 0,32 ppm beobachtet werden. Die Mortalität in allen anderen Kombinationen entsprach den Mortalitäten in der Behandlung mit MA-K. Ähnliches gilt für die MA-7-Varianten. Hierbei wirkte die Kombination aus $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml MA-7 und 0,32 ppm Fipronil besser als MA-7 allein. Alle anderen Kombinationen verursachten aber keine höhere Mortalität als der Pilz. Die Effekte der beiden Kombinationen mit den höheren Mortalitäten waren hier im Gegensatz zu den Untersuchungen an Nymphen synergistisch. Über die Ursache kann auch hier nur spekuliert werden. Im Gegensatz zu den Versuchen mit Nymphen ($1,0 \times 10^3$ oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml) wurde gegen die Adulten eine höhere Konzentration von *M. anisopliae* ($1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml) eingesetzt. Es sollten also genügend lebensfähige Konidien überbleiben, um eine Infektion zu initialisieren und eine Mortalität hervorzurufen. Gleichzeitig konnte bei genügend hoher Konidien-Konzentration eine höhere Fipronil-Konzentration in der Kombination eine bessere Mortalität erzielen, da die höhere Konzentration eher einen Effekt (Stresseffekt) auf die Zecke hat als die niedrigere.

Bei Behandlung von Thripsen (*Frankliniella occidentalis*) bzw. Dickmaulrüsslern (*Otiiorhynchus sulcatus*) mit $1,0 \times 10^{10}$ Konidien/l/Substrat von *M. anisopliae* (V275) und 100 ppm Fipronil wurden neutrale Effekte gefunden (Ansari *et al.* 2007, Shah *et al.* 2007). Genauere Untersuchungen der Konidien ergaben allerdings höhere Dichten und Keimraten bzw. -geschwindigkeiten auf den Larven der Dickmaulrüssler in den Kombinationsbehandlungen. Shah *et al.* (2007) gehen davon aus, dass Fipronil entweder *M. anisopliae* direkt stimuliert oder aber durch Veränderungen im Insekt die Infektion beschleunigt wird. Verhaltensänderung, wie die Erhöhung oder Reduktion der Bewegung bzw. die Unterdrückung des Putzverhaltens sind bei vielen Schadinsekten für eine erfolgreiche Infektion von Bedeutung (Jaramillo *et al.* 2005, Roditakis *et al.* 2000, Moino Jr. und Alves 1998). Ob dies für die ungesogenen Adulten von *A. hebraeum* auch zutrifft oder ob Fipronil *M. anisopliae* direkt stimuliert, kann aus den vorliegenden Daten nicht abgeleitet werden.

2.4.4 Fazit

Insgesamt scheint ein Potenzial für die Verbesserung der Wirkung von *M. anisopliae* auf *A. hebraeum* zumindest durch Fipronil vorhanden zu sein, wenn *M. anisopliae* in einer genügend hohen Konzentration mit Fipronil kombiniert wird. Eine interessante Möglichkeit zur Kontrolle von *A. hebraeum* würde eine Pheromonfalle in Kombination mit *M. anisopliae* und Schädlingsbekämpfungsmitteln darstellen. Ungesogene Zecken von *A. hebraeum* bevorzugen bereits befallene Wirte, die sie über ein von den Männchen produziertes Aggregations-Anheftungs-Pheromon finden (Norval *et al.* 1989). Verschiedene Studien bestätigten die Effizienz solcher Pheromonfallen (Bryson *et al.* 2000, Norval *et al.* 1992) und zeigten auch das Potenzial der Zeckenkontrolle an Wirtstieren auf (Norval *et al.* 1996a, Rechav und Whitehead 1978).

Eine Möglichkeit wäre es, statt der Schädlingsbekämpfungsmittel die Kombinationen aus *M. anisopliae* und Schädlingsbekämpfungsmitteln mit Pheromonfallen einzusetzen, um so einerseits die Belastung durch Schädlingsbekämpfungsmittel auf einem niedrigen Niveau zu halten und andererseits die Effizienz der Pilzwirkung zu erhöhen und evtl. das sekundäre Verbreitungspotenzial von *M. anisopliae* nutzen zu können. Es sind aber zunächst weitere Studien zur Untersuchung der dosisabhängigen Veränderung der Effekte von Schädlingsbekämpfungsmitteln auf *M. anisopliae* erforderlich.

Kapitel 3: Additive Effekte der Kombination aus *Metarhizium anisopliae* und Fipronil auf ungesogene Adulte von *Rhipicephalus sanguineus*

Zusammenfassung

Die Braune Hundezecke *Rhipicephalus sanguineus* ist weltweit verbreitet und vornehmlich auf Hunden zu finden, bei denen auch mehrmaliger Befall keine Immunität induziert. Eine Kontrolle ist aufgrund der Übertragung von veterinär- und humanmedizinisch bedeutenden Pathogenen notwendig und geschieht meist über chemische Ektoparasitizide. Aufgrund von toxikologischen Bedenken, Effekten auf Nicht-Zielorganismen und Resistenzen wäre es wünschenswert, ein wirksames biologisches Präparat anstelle eines Schädlingsbekämpfungsmittels nutzen zu können. Entomopathogene Pilze sind in dieser Hinsicht vielversprechende Organismen für eine biologische Schädlingsbekämpfung, da sie u. a. einfach in großen Mengen herzustellen sind und wie herkömmliche Schädlingsbekämpfungsmittel angewendet werden können. Außerdem haben sie ein sekundäres Verbreitungspotenzial (Potenzial zu Epizootien) und sind relativ sicher für Nicht-Zielorganismen. Allerdings variiert die Wirksamkeit der entomopathogenen Pilze abhängig von den vorliegenden Umweltbedingungen und weiteren Faktoren stark. Eine Möglichkeit, ihre Wirksamkeit zu erhöhen, ist der Einsatz einer Kombination aus entomopathogenem Pilz und niedrig dosiertem Schädlingsbekämpfungsmittel, welches eine Verhaltensveränderung der Zielorganismen und damit verstärkten Kontakt mit den infizierenden Sporen ermöglicht oder die Immunantwort der Zielorganismen durch Stress herabsetzen kann.

In diesem Teil der Arbeit wurden ungesogene Männchen und Weibchen von *R. sanguineus* in *in vitro* Versuchen untersucht. Zunächst wurden die subletalen Fipronil-Konzentrationen und die Konzentrationen der beiden entomopathogenen Pilzstämme *Metarhizium anisopliae* MA-K und MA-7 mit geringem Wirkungsgrad mit einer Tauchmethode ermittelt. Die ermittelten Konzentrationen von Fipronil und den *M. anisopliae*-Stämmen wurden im nächsten Schritt kombiniert angewendet. Die Mortalität wurde dabei zweimal die Woche über 35 Tage bestimmt.

Es wurde sowohl für die Männchen als auch für die Weibchen eine erhöhte Mortalität in einigen Kombinationsansätzen aus *M. anisopliae* und Fipronil gegenüber den Einzelbehandlungen beobachtet. Außerdem setzte die Mortalität in einigen Kombinationsbehandlungen mindestens zwei Tage früher ein als in den Einzelbehandlungen. Die gefundenen Effekte ließen sich als additiv einstufen. Eine kombinierte Anwendung von *M. anisopliae* und Fipronil gegen *R. sanguineus* ist also möglich und in ausgewählten

Kombinationen in der Lage, die Wirkgeschwindigkeit des Pilzes zu verbessern. Allerdings sollten weitere Studien zur Stabilisierung der Wirkungssicherheit durchgeführt werden.

Keywords: *Rhipicephalus sanguineus*, *Metharizium anisopliae*, Fipronil, additive Effekte, biologische Zeckenkontrolle

3.1 Einleitung

Die Braune Hundezecke *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae) ist eine dreiwirtige Zecke der Gattung *Rhipicephalus*. Sie ist weltweit verbreitet, hauptsächlich aber zwischen den Längengraden 30 °S and 50 °N zu finden (Walker *et al.* 2000). Wie der deutsche Name andeutet, befällt die Zecke vornehmlich Hunde, allerdings nicht ausschließlich (Nicholson *et al.* 2009). Auf ihren Hauptwirt ist sie gut angepasst, da auch mehrmaliger Befall durch *R. sanguineus* bei Hunden keine Immunität induziert (Szabó und Bechara 1999, Theis und Budwiser 1974). Zecken dieser Art sind klein und haben einen gestreckten Körper. Sie haben Augen und kurze Palpen, keine Muster auf dem Schild, dafür aber kleinere Einsackungen, die über das ganze Schild verteilt sind (Dantas-Torres 2008, Walker *et al.* 2000). Ungesogene Männchen sind rötlich braun und zwischen 2,28 mm und 3,18 mm lang und 1,11 mm bis 1,68 mm breit. Weibchen ähneln im ungesogenen Zustand den Männchen in ihrer Länge (2,4 mm – 2,7 mm), Breite (1,44 mm – 1,68 mm), Form und Farbe. Durch die Blutmahlzeit können sie auf eine Länge von 11,5 mm und eine Breite von 7,5 mm anschwellen und eine graublau bis olive Färbung annehmen (Dantas-Torres 2008). Der Saugakt dauert bei Weibchen zwischen 6 und 19 Tagen (Bechara *et al.* 1995, Pegram *et al.* 1987). Für die Eiablage verlassen sie den Wirt und suchen einen geschützten Ort auf. Dieser befindet sich meist in der Nähe von Ruhe- oder Schlafplätzen der Wirte, was den frischgeschlüpften Larven die Wirtsfindung erleichtert (Dantas-Torres 2008). Nach der drei- bis siebentägigen Präovipositionsphase (Bechara *et al.* 1995, Pegram *et al.* 1987) werden innerhalb von 15 – 18 Tagen (Jittapalapong *et al.* 2000, Koch 1982) 2000 bis 4000 Eier abgelegt (Goddard 1987), danach stirbt das Weibchen. Männchen können im Gegensatz dazu mehrere Blutmahlzeiten zu sich nehmen und lange auf einem Wirt bleiben (Dantas-Torres 2010). Es ist aber auch möglich, dass sie zwischen verschiedenen Hunden wechseln (Little *et al.* 2007). Unter günstigen Bedingungen kann der Lebenszyklus innerhalb von circa 90 Tagen vollendet werden (Louly *et al.* 2007, Bechara *et al.* 1995). Die Dauer variiert aber je nach Region und Populationen, da die Entwicklung direkt von Temperatur und Wirtsverfügbarkeit beeinflusst wird (Dantas-Torres 2008, Mumcuoglu *et al.* 1993). Feldstudien haben gezeigt, dass bis zu vier Generationen in einem Jahr möglich sind (Louly *et al.* 2007, Dantas-Torres und Figueredo 2006). Bei ungünstigen Bedingungen kann ein Generationszyklus jedoch bis zu zwei Jahre in Anspruch nehmen (Mehlhorn und Mehlhorn 1996), wobei die einzelnen Stadien unterschiedlich lange ohne Wirt überleben können (Larven circa 8,5 Monate, Nymphen circa 6 Monate und Adulte circa 19 Monate) (Goddard 1987). Ihre Hauptaktivität reicht in gemäßigten Zonen von Anfang des Frühjahrs bis zum Ende des Herbsts, während sie

in wärmeren Zonen ganzjährig aktiv sind (Kahn 2010, Louly *et al.* 2007, Goddard 1987). Den überwiegenden Teil ihres Lebens verbringt *R. sanguineus* jedoch, wie die meisten dreiwirtigen ixodiden Zecken, nicht auf einem Wirt (Needham und Teel 1991). Für diese Zeiten sucht sich die Braune Hundezecke aber, im Gegensatz zum Großteil der ixodiden Zecken, kein Versteck in der Natur, sondern zieht sich bevorzugt in Gebäude in die Nähe der Haustierschlafplätze zurück (Dantas-Torres 2008, Goddard 1987, Hoffmann 1980).

Eine Kontrolle der Zeckenpopulation ist aufgrund der Übertragung von veterinär- und humanmedizinisch bedeutenden Pathogenen, u. a. *Babesia canis* (Hunde-Babesiose), *Ehrlichia canis* (Tropische Canine Panzytopenie) sowie *Rickettsia rickettsii* (Rocky-Mountain-Fleckfieber) und *Rickettsia conorii* (Mittelmeer-Fleckfieber) notwendig (Nicholson *et al.* 2009, Dantas-Torres 2008). Die konventionelle Kontrolle greift zumeist auf chemische Ektoparasitizide zurück, wobei zur Vermeidung einer weiteren Verbreitung in Gebäuden eine Bekämpfung sowohl am Hund als auch in den kontaminierten Räumen erforderlich ist (Mehlhorn und Mehlhorn 1996). Diverse Sicherheitsvorschriften schränken den Gebrauch der meisten Präparate allerdings ein (z. B. Einschränkung des Kontakts zum behandelten Tier und Meidung der behandelten Räume) (Khan 2010, Hoffmann 1992). Aus diesen Gründen wäre es wünschenswert, ein wirksames biologisches Präparat zu verwenden, von dem keine Gesundheitsgefahren ausgehen. Dieses wäre bei den relativ sicheren entomopathogenen Pilzen gewährleistet (Zimmermann 2007, Roberts und St. Leger 2004). Die Wirksamkeit von entomopathogenen Pilzen an *R. sanguineus* ist in einigen Studien bereits untersucht worden. In diesen wurde festgestellt, dass eine Kontrolle von allen Stadien durch *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 (Hypocreales: Clavicipitaceae) möglich ist (z. B. Garcia *et al.* 2008, Reis *et al.* 2008, Samish *et al.* 2001). Allerdings konnte eine 100 %ige Mortalität der Adulten meist erst 21 Tage nach der Behandlung erzielt werden (Gindin *et al.* 2002, Samish *et al.* 2001). Es wäre möglicherweise aussichtsreich, durch die Zugabe einer geringen Menge eines herkömmlichen Schädlingsbekämpfungsmittels die Wirkung von *M. anisopliae* zu intensivieren. Auch die Belastung der Nicht-Zielorganismen würde aufgrund der geringen Konzentration der chemischen Schädlingsbekämpfungsmittel im Vergleich zu konventionellen Verfahren gesenkt. Als möglicher Kandidat für eine Kombination wurde nach Prüfung der Kompatibilität mit den Stämmen MA-K und MA-7 (siehe Kapitel 1) Fipronil ausgewählt. Fipronil zeichnet sich durch eine schnelle Kontakt- und eine lang anhaltende Residualwirkung aus, wodurch zwischen den einzelnen Anwendungen lange Zeiträume liegen können (Blagburn und Lindsay 2001, Wiedemann 2000, Postal *et al.*

1995). Außerdem ist es für Vertebraten weitestgehend ungefährlich (Ungemach 2010, Kunkle 1997).

Die Behandlung erfolgte an ungesogenen Adulten. Zunächst wurden die subletale Konzentration von Fipronil sowie die Konzentrationen mit geringem Wirkungsgrad der beiden *M. anisopliae*-Stämme ermittelt. Diese ermittelten Konzentrationen wurden dann in einem Folgeschritt als Kombinationen getestet.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Handhabung der Zecken

Die vollgesogenen Nymphen von *R. sanguineus* wurden von der Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen zur Verfügung gestellt. Gefüttert wurden die ungesogenen Nymphen dort an Kaninchen. Für die Fütterung wurde ein Baumwollbeutel mit (hautfreundlichem) Klebstoff an den Kaninchenohren befestigt, in den die ungesogenen Nymphen überführt wurden. Sofort nach dem Abfallen der vollgesogenen Nymphen wurden diese versendet und kamen ein bis zwei Tage später am Versuchsort an. Sie wurden bei 23 ± 2 °C und 75 % relativer Luftfeuchte gehalten, bis nach drei bis vier Wochen Adulte schlüpften. Die ungesogenen Adulten wurden nach Geschlecht aufgeteilt und binnen zwei Wochen nach ihrem Schlupf getestet. Bis zum Versuch wurden die Zecken bei 14 °C aufbewahrt, und am Versuchstag wurde gewartet, bis die Zecken auf Zimmertemperatur erwärmt waren.

3.2.2 Ermittlung der subletalen Konzentrationen von Fipronil

Das Präparat Fipronil (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) lag als Reinstoff in Pulverform vor. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften wurde die höchste Fipronil-Konzentration (1000 ppm) mit 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) in eine wässrige Lösung gebracht. Der DMSO-Anteil in den übrigen Fipronil-Ansätzen nahm jeweils um den Faktor fünf ab. Zur Ermittlung der subletalen Konzentrationen von Fipronil für ungesogene Adulte wurden die Zecken mittels einer Tauchmethode behandelt. Es wurden 16 ml von sieben Konzentrationen von Fipronil (0,064 bis 1000 ppm) getestet. Als Kontrolle diente 5 % DMSO. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung wurde mit je 25 Weibchen und 25 Männchen je Konzentration von Fipronil bzw. der Kontrolle ermittelt.

3.2.3 Ermittlung der konzentrationsabhängigen Wirkungsgrade von MA-K und MA-7

Es wurden die *M. anisopliae*-Stämme MA-K und MA-7 (Volcani Center, Bet Dagan, Israel) verwendet. Beide Pilzstämme wurden zwei bis drei Wochen lang auf Kartoffel-Dextrose-Agar

(39,5 g/l), der mit Hefeextrakt (5 g/l) und Pepton (5 g/l) angereichert wurde, in einer Klimakammer bei 25 ± 1 °C und einer Licht-Dunkel-Periode von 16 Stunden zu 8 Stunden angezogen. Die Konidien wurden abgeerntet und in sterilem *Aq. dest.*, das mit 0,05 % Tween[®]80 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) versetzt war, suspendiert. Zur Bestimmung der subletalen Konzentration wurden jeweils 15 ml der Konidienkonzentrationen von $1,0 \times 10^1$ bis $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml mittels der Tauchmethode verwendet. 0,05 % Tween80 diente als Kontrolle. Die Pilzkonzentrationstests wurden zweimal mit insgesamt 40 Weibchen und 31 Männchen je Konzentration der *M. anisopliae*-Stämme bzw. der Kontrolle durchgeführt.

3.2.4 Versuche mit den Kombinationen aus *M. anisopliae* und Fipronil

In einem weiteren Schritt wurden die subletalen Fipronil-Konzentrationen und die Konzentrationen mit geringem Wirkungsgrad der beiden *M. anisopliae*-Stämme kombiniert. Anwendung fand die Tauchmethode, wobei pro Testsubstanz (allein oder in Kombination) 15 ml zum Tauchen verwendet wurden. Die Kombinationen enthielten 0,15 ml DMSO, in dem 6,4 oder 32 ppm Fipronil gelöst wurde, und 14,85 ml 0,05 % Tween80, in dem $1,01 \times 10^3$ oder $1,01 \times 10^4$ Konidien/ml von *M. anisopliae* suspendiert waren. Es ergaben sich die folgenden Testkonzentrationen: 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil mit $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml MA-K bzw. MA-7. Die verwendeten Fipronil- und MA-K/MA-7-Konzentrationen wurden jeweils auch einzeln getestet. Bei allen Versuchen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO als Kontrollen. Die Kombinationsversuche wurden zweimal mit insgesamt 40 Weibchen und 31 Männchen pro Testsubstanz durchgeführt.

3.2.5 Behandlung und Inkubation

Ungesogene Adulte wurden für 60 Sekunden in eine Testsuspension (oder Kontrolle) getaucht. Nach Abtrocknen wurden die Zecken einzeln auf mit 0,3 ml sterilem *Aq. dest.* angefeuchtetem Filterpapier in Petrischalen gesetzt. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und je 16 Petrischalen wurden auf ein mit 10 ml Wasser angefeuchtetes Tuch in eine Bellaplast-Schale (Rausch Verpackung GmbH, Augsburg) gestellt. Die Schalen wurden mit einem Deckel verschlossen und bei 23 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchte von 75 % im Dunkeln in einer Klimakammer inkubiert. Die Mortalität wurde 14 Tage nach der Behandlung mit Fipronil überprüft. Bei Versuchen mit *M. anisopliae* wurde die Mortalität zweimal pro Woche für 28 Tage (Dosis-Wirkungs-Versuche) bzw. 35 Tage (Kombinationsversuche) kontrolliert.

3.2.6 Statistik

Die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven und die Berechnung der LC-Werte wurden mit dem Programm PriProbit Version 1.63 (Sakuma 1996 – 2000) durchgeführt. Neben den LC₅₀- und LC₉₅-Werten wurden auch die 95 % Fiduzialintervalle (Toleranzgrenze für die LC-Werte) berechnet. Zusätzlich zu der sigmoiden Kurve wurde die lineare Probitkurve mit dem 95 % Fiduzialintervall und zugehöriger Geradengleichung dargestellt.

Weitere statistische Analysen wurden mit PASW 17 (Predictive Analysis SoftWare, SPSS Inc.) durchgeführt. Signifikante Unterschiede der einzelnen Konzentrationen zur Kontrolle sowie Unterschiede zwischen den Geschlechtern und zwischen den Pilzstämmen wurden mittels χ^2 -Tests bestimmt. Bei allen χ^2 -Tests betrug der Freiheitsgrad eins ($df = 1$). Aufgrund des Versuchsdesigns (jede Zecke wurde einzeln gehalten) war eine Korrektur der Mortalität und somit der direkte Vergleich der Kombinationen aus *M. anisopliae* und Fipronil mit dem *M. anisopliae*-Stamm oder der Fipronil-Konzentration nicht möglich. Daher wurde nur auf signifikante Unterschiede zwischen den Varianten und den jeweiligen Kontrollen getestet. Zusätzlich wurde ein Chancenverhältnis (odds-ratio) für jede Variante und ihre Kontrolle berechnet, um so die Wahrscheinlichkeit bestimmen zu können, mit der ein Todesereignis in der Variante oder in der Kontrolle auftreten würde. Ist das Chancenverhältnis dabei gleich eins ($CV = 1$), kann man von einer Homogenität der beiden Gruppen ausgehen. Bei einem Wert größer als eins ($CV > 1$) ist das Auftreten der Mortalität in den Varianten wahrscheinlicher als in der Kontrolle. Bei einem Wert kleiner eins ($CV < 1$) verhält es sich genau umgekehrt (Hatzinger und Nagel 2009, Polasek 2008). In den Fällen, in denen aufgrund von fehlender Mortalität in der Kontrolle eine Berechnung des Chancenverhältnisses nicht möglich war, wurden die χ^2 -Werte zu Hilfe genommen. Die Mortalität wurde für einzelne Behandlungen über den Versuchszeitraum mit dem Log-Rang-Test analysiert. Eine Analyse der Mortalitätsverläufe getrennt nach Geschlechtern in den unterschiedlichen Behandlungen erfolgte ebenfalls mit dem Log-Rang-Test. Das Signifikanzniveau wurde für alle Tests mit $p < 0,05$ angenommen. Hinweise auf signifikante Unterschiede in Abbildungen erfolgten mit Sternchen nach folgender Einteilung: $p > 0,05 = \text{n.s.}$ (nicht signifikant), $0,05 > p \geq 0,01 = *$, $0,01 > p \geq 0,001 = **$, $p < 0,001 = ***$.

Für Kombinationen, die eine signifikant höhere oder niedrigere Mortalität als die Tween- und DMSO-Kontrolle aufwiesen, wurde der vorliegende Effekt (additiv, synergistisch oder antagonistisch) mittels eines χ^2 -Tests bestimmt (Morales-Rodriguez und Peck 2009, McVay *et al.* 1977). Zunächst wurde die erwartete Mortalität (M_E) der Kombinationen mittels der prozentualen Gesamtmortalität (der Mortalität des letzten Versuchstages), die durch

M. anisopliae (M_{MA}) und das Schädlingsbekämpfungsmittel (M_{SBM}) allein verursacht wurde, mit folgender Formel berechnet:

$$M_E = M_{MA} + \left(M_{SBM} \times \left(1 - \frac{M_{MA}}{100} \right) \right)$$

Mit der erwarteten Mortalität und der beobachteten Mortalität der Kombinationen (M_{Kombi}) wurde ein $\chi^2_{(E)}$ -Wert berechnet:

$$\chi^2_{(E)} = \frac{(M_{Kombi} - M_E)^2}{M_E}$$

Dieser $\chi^2_{(E)}$ -Wert wurde mit dem χ^2 -Tabellenwert für einen Freiheitsgrad ($df = 1$) und dem 0,95 Quantil ($\chi^2 = 3,84$) verglichen. Ein nicht-additiver Effekt war zu beobachten, wenn der berechnete $\chi^2_{(E)}$ -Wert größer als der Tabellenwert war. Wenn die Differenz aus beobachteter und erwarteter Mortalität der Kombination positiv war, wurde die signifikante Interaktion als synergistisch, wenn sie negativ war als antagonistisch eingestuft (Finney 1947).

3.3 Ergebnisse

3.3.1. Ermittlung der subletalen Konzentrationen von Fipronil

Bei den Dosis-Wirkungs-Versuchen von Fipronil starben weder Weibchen noch Männchen, wenn sie mit 5 % DMSO behandelt wurden. Die Behandlungen mit den niedrigen Fipronil-Konzentrationen von 0,064 und 0,32 ppm wirkten weder auf die Weibchen noch auf die Männchen ($\chi^2 \leq 0,98$, $p \geq 0,32$) (Abb. 28). Die Behandlung mit 1,6 ppm Fipronil verursachte dagegen bei Weibchen und Männchen eine höhere Mortalität als die Behandlung mit DMSO ($\chi^2 \geq 16,78$, $p < 0,001$). Nach Behandlung mit 8 ppm starben alle Männchen ($\chi^2 = 51,0$, $p < 0,001$), aber nur 76 % der Weibchen ($\chi^2 = 34,2$, $p < 0,001$). Alle Weibchen starben, wenn sie mit 40 ppm oder mehr behandelt wurden ($\chi^2 = 50$, $p < 0,001$). Daraus errechnete sich 14 Tage nach Behandlung ein LC_{50} -Wert von 1,14 (0,46 – 1,55) ppm bzw. 1,55 (0,03 – 1,59) ppm für Männchen bzw. Weibchen. Der LC_{95} -Wert lag für die Männchen bei 3,03 (2,06 – 21,1) ppm und für die Weibchen bei 6,6 (2,04 – 2400) ppm (Abb. 28). Es gab zwischen den Geschlechtern auch bis auf die Behandlung mit 8 ppm ($\chi^2 = 7,1$, $p = 0,008$) keine Unterschiede bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber Fipronil ($\chi^2 \leq 2,6$, $p \geq 0,1$). Für die Kombinationsversuche wurden die Konzentrationen von 0,064 ppm und 0,32 ppm ausgewählt.

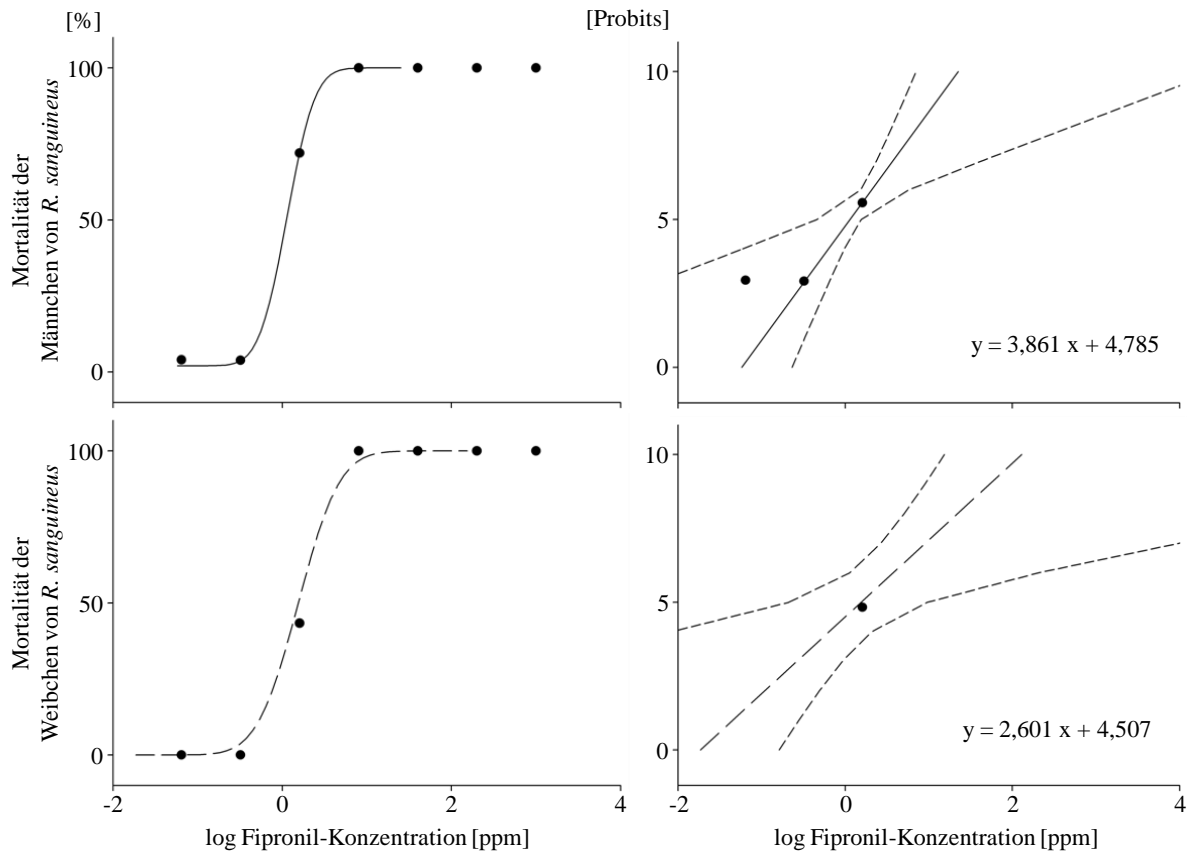


Abb. 28: Anteil der toten, ungesogenen Adulten von *R. sanguineus* ($n = 25$) in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Fipronil-Konzentrationen 14 Tage nach der Behandlung. Kurven stellen berechnete Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Prozent oder Probits mit 95 % Fiduzialintervall dar. Als Kontrollsubstanz diente 5 % DMSO. Die Kontrollmortalität lag für die Weibchen und Männchen bei 0 %. Der LC_{50} -Wert lag für die Männchen bei einer Konzentration von 1,14 (0,46 – 1,55) ppm und für die Weibchen bei einer Konzentration von 1,55 (0,03 – 1,59) ppm.

3.3.2. Ermittlung der konzentrationsabhängigen Wirkungsgrade von MA-K und MA-7

In der Tween-Kontrolle starben innerhalb von 28 Tagen kein Männchen und nur ein Weibchen. Aus 96,8 % der mit *M. anisopliae* behandelten toten Weibchen und Männchen wuchs Pilzmyzel aus. Die Mortalität in den Behandlungen von $1,0 \times 10^1$, $1,0 \times 10^2$, $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml von MA-K und MA-7 unterschied sich nicht von der in der Kontrolle ($\chi^2 \leq 3,12$, $p \geq 0,077$). Es starben aber mehr Männchen und Weibchen als in der Kontrolle, wenn sie mit $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml oder mehr von MA-7 oder MA-K behandelt wurden ($\chi^2 \geq 6,64$, $p \leq 0,01$). Ab einer Konzentration von $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml von MA-K oder MA-7 starben alle Männchen und Weibchen innerhalb von 28 Tagen ($\chi^2 \geq 58,13$, $p < 0,001$). Damit berechnete sich für MA-K ein LC_{50} -Wert (nach 28 Tagen) von $3,54 \times 10^4$ ($1,99 \times 10^4 - 5,75 \times 10^4$) Konidien/ml für die Weibchen und von $2,37 \times 10^4$ ($3,26 \times 10^2 - 8,58 \times 10^9$) Konidien/ml für die Männchen (Abb. 29). Der errechnete LC_{95} -Wert lag für Weibchen bei $5,59 \times 10^5$ ($2,75 \times 10^5 - 1,94 \times 10^6$) Konidien/ml MA-K und für Männchen bei $1,82 \times 10^6$ ($1,02 \times 10^4 -$

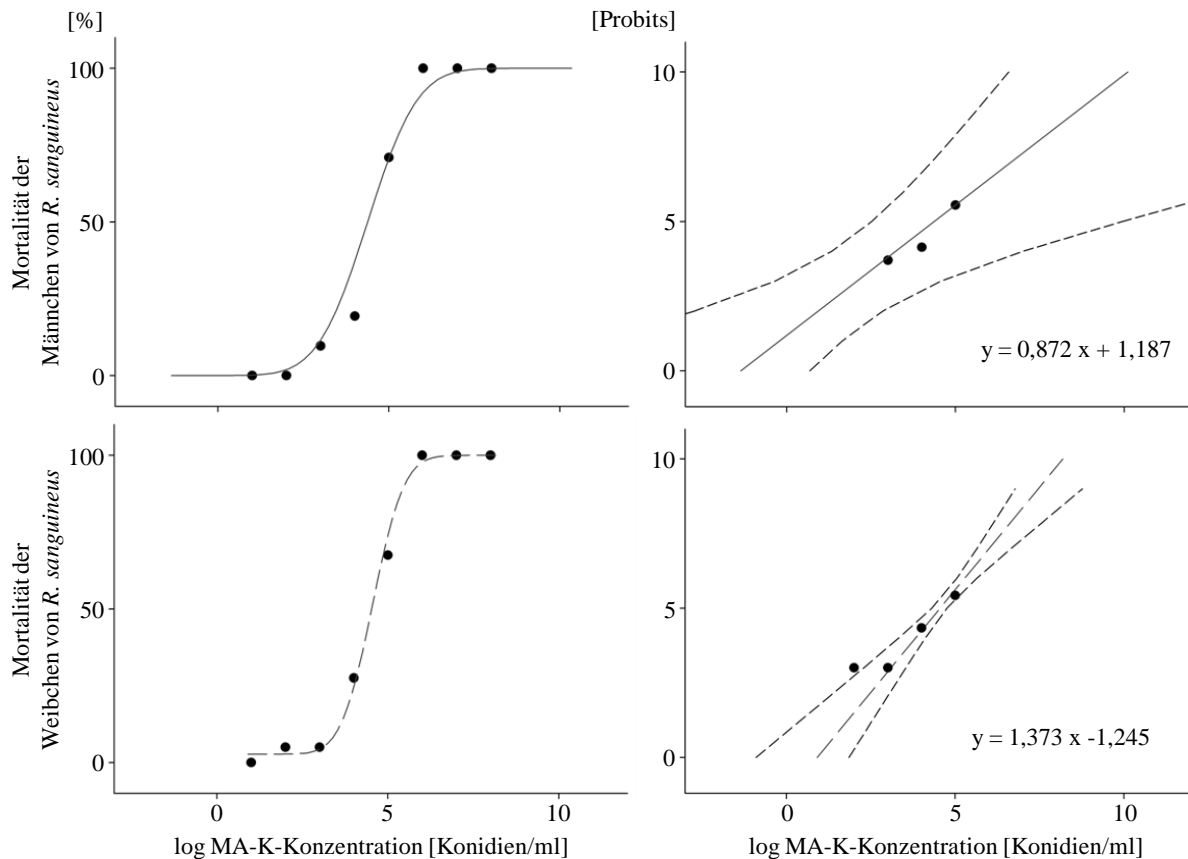


Abb. 29: Anteil der toten, ungesogenen Adulten von *R. sanguineus* (n = 31 [Männchen], n = 40 [Weibchen]) in Abhängigkeit von den unterschiedlichen MA-K-Konzentrationen 28 Tage nach der Behandlung. Kurven stellen berechnete Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Prozent oder Probits mit 95 % Fiduzialintervall dar. Als Kontrollsubstanz diente 0,05 % Tween80. Die Kontrollmortalität lag für die Weibchen bei 2,50 % und für die Männchen bei 0 %. Der LC₅₀-Wert lag für die Männchen bei einer Konzentration von $2,37 \times 10^4$ ($3,26 \times 10^2 - 8,58 \times 10^9$) Konidien/ml und für die Weibchen bei $3,54 \times 10^4$ ($1,99 \times 10^4 - 5,75 \times 10^4$) Konidien/ml.

$1,62 \times 10^{15}$) Konidien/ml. Die Berechnung des LC₅₀-Wertes für MA-7 ergab für Weibchen eine Konzentration von $1,77 \times 10^4$ Konidien/ml und für Männchen eine von $5,14 \times 10^4$ ($1,93 \times 10^4 - 1,01 \times 10^5$) Konidien/ml (Abb. 30). Der LC₉₅-Wert lag bei $2,41 \times 10^6$ Konidien/ml für die Weibchen und bei $1,49 \times 10^6$ ($5,86 \times 10^4 - 1,01 \times 10^7$) Konidien/ml für die Männchen.

Weibchen und Männchen reagierten auf MA-K und MA-7 gleich ($\chi^2 \leq 0,8$, $p \geq 0,4$ [MA-K], $\chi^2 \leq 2,4$, $p \geq 0,1$ [MA-7]). Eine Ausnahme bildete die Behandlung mit $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml MA-7, auf die Weibchen empfindlicher als Männchen reagierten ($\chi^2 = 10,8$, $p = 0,001$).

Zwischen den Pilzen gab es nur bei $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml bei den Männchen einen Unterschied in der Wirksamkeit ($\chi^2 = 4,2$, $p = 0,039$). Alle anderen Konzentrationen der beiden Pilzstämme unterschieden sich aber weder für Weibchen noch für Männchen in ihrer

Wirksamkeit ($\chi^2 \leq 3,1$, $p \geq 0,077$). Für die Kombinationsversuche wurden $1,0 \times 10^3$ und 10^4 Konidien/ml für MA-K und MA-7 ausgewählt.

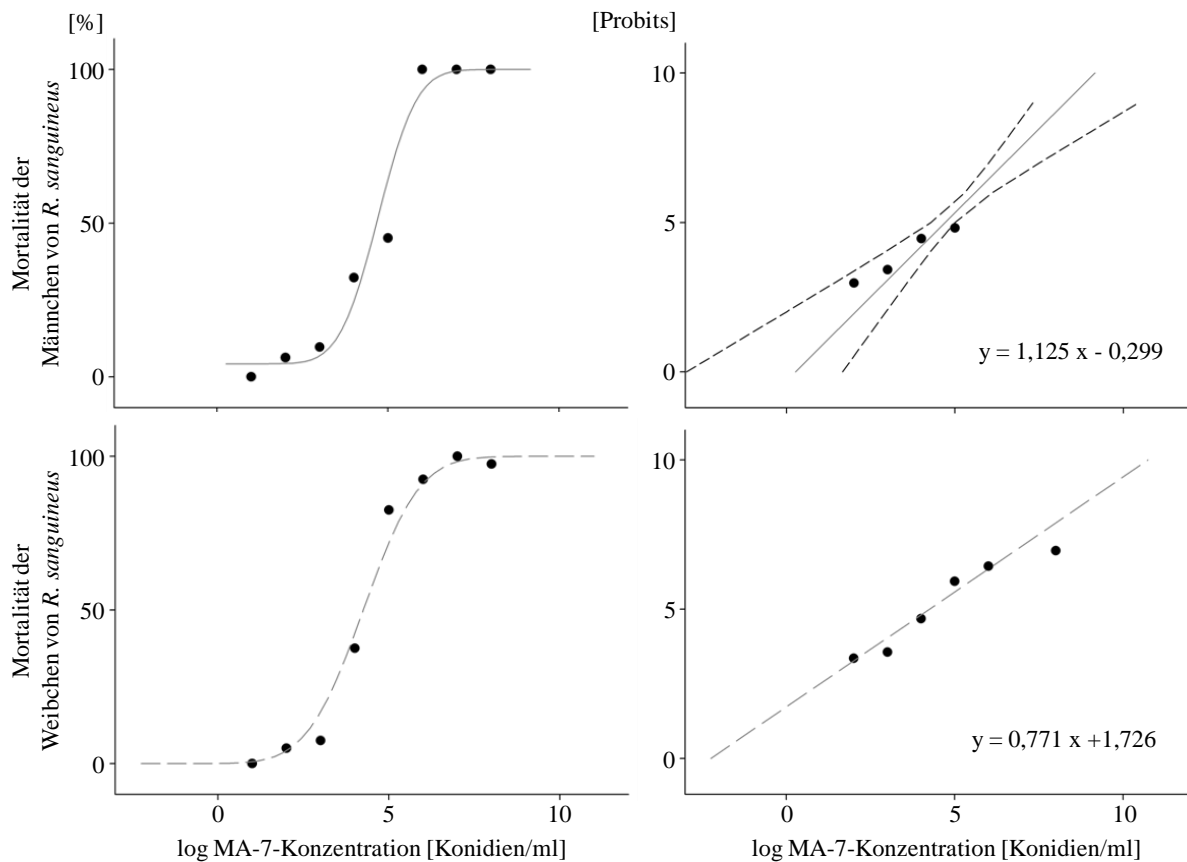


Abb. 30: Anteil der toten, ungesogenen Adulten von *R. sanguineus* ($n = 31$ [Männchen], $n = 40$ [Weibchen]) in Abhängigkeit von den unterschiedlichen MA-7-Konzentrationen 28 Tage nach der Behandlung. Kurven stellen berechnete Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Prozent oder Probits mit 95 % Fiduzialintervall dar. Als Kontrollsubstanz diente 0,05 % Tween80. Die Kontrollmortalität lag für die Weibchen bei 2,5 % und für die Männchen bei 0 %. Der LC_{50} -Wert lag für die Männchen bei einer Konzentration von $5,14 \times 10^4$ ($1,93 \times 10^4 - 1,01 \times 10^5$) Konidien/ml und für die Weibchen bei $1,77 \times 10^4$ Konidien/ml.

3.3.3 Versuche mit den Kombinationen aus *M. anisopliae* und Fipronil

3.3.3.1 Männchen

Bei der Behandlung mit 0,05 % Tween80, 1 % DMSO, 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil starben innerhalb von 35 Tagen 0 % bis 20 % der Männchen. Die Mortalitäten in den Behandlungen von 0,064 ppm Fipronil und 1 % DMSO unterschieden sich nicht voneinander ($\chi^2 = 0,00$, $p = 0,99$). Die höhere Fipronil-Konzentration verursachte aber eine höhere Mortalität als DMSO ($\chi^2 = 3,94$, $p = 0,047$).

3.3.3.1.1 MA-K und Fipronil

Die Mortalität, die durch die Behandlung mit $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml allein verursacht wurde, unterschied sich nicht von der Mortalität in der Tween-Behandlung ($\chi^2 = 2,03$, $p = 0,15$).

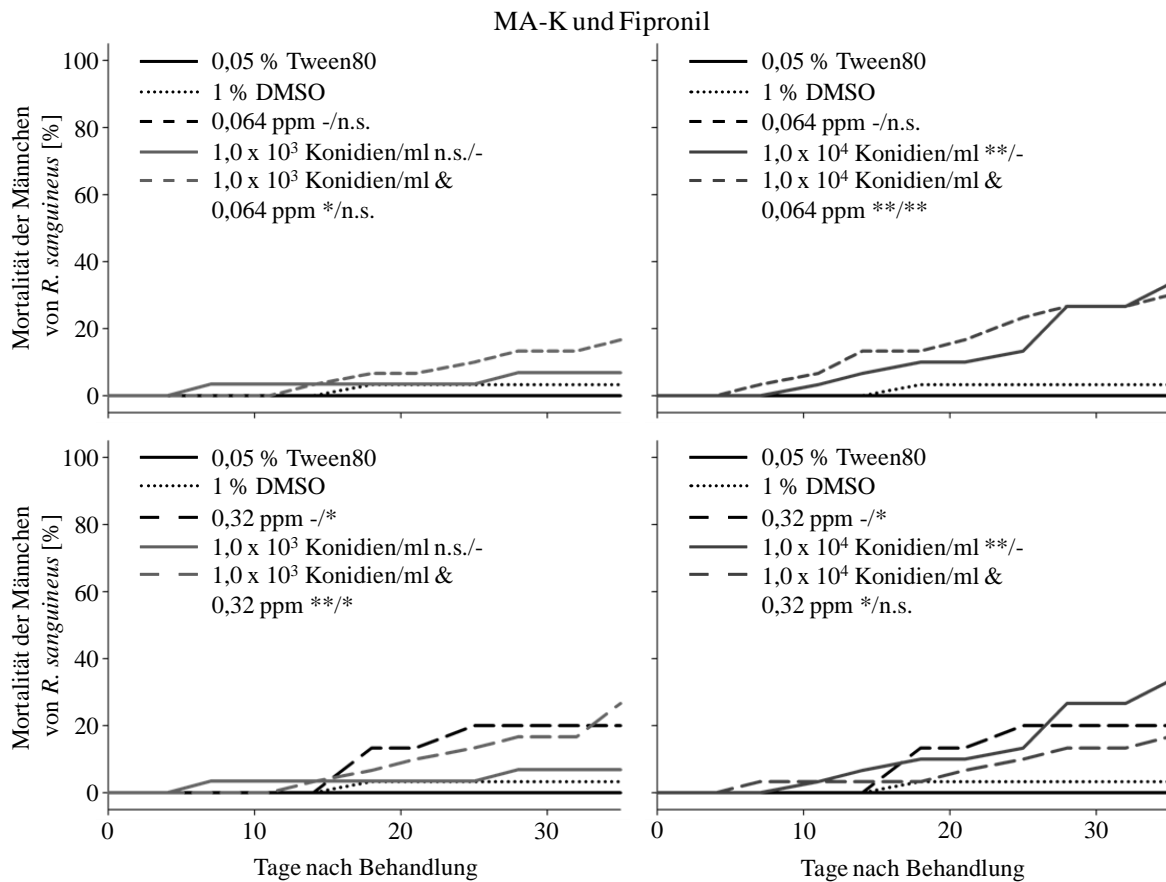


Abb. 31: Mortalität der ungesogenen Männchen von *R. sanguineus* über den Versuchszeitraum von 35 Tagen. Behandelt wurden die Männchen mit $1,0 \times 10^3$ oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-K und mit 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO an (Log-Rang-Test mit $df = 1$) ($n = 30$).

Die Mortalität in den beiden Kombinationen aus MA-K und Fipronil unterschied sich aber signifikant von der Tween-Behandlung ($\chi^2 \geq 5,36$, $p \leq 0,021$). Die Mortalität in den Kombinationen war auch (tendenziell) höher als die in der DMSO-Behandlung ($\chi^2 = 2,88$, $p = 0,09$ [MA-K mit 0,064 ppm], $\chi^2 = 6,14$, $p = 0,013$ [MA-K mit 0,32 ppm]) (Abb. 31). Die Chancenverhältnisse zur Tween-Kontrolle konnten nicht berechnet werden; es zeigte sich aber an den χ^2 -Werten, dass sich die Mortalität mit zunehmender Fipronil-Konzentration in der Kombination erhöhte und höher war als die von MA-K verursachte. Die Chancenverhältnisse zu DMSO waren für beide Kombinationen höher als die der dazugehörigen Fipronil-Konzentrationen (Tab. 11). Die Kombination aus $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml und 0,32 ppm Fipronil war additiv.

Die MA-K-Konzentration von $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml allein oder in Kombination mit 0,064 oder 0,32 ppm verursachte jeweils eine höhere Mortalität als die Tween-Kontrolle ($\chi^2 \geq 5,37$, $p \leq 0,021$). Allerdings nahmen die χ^2 -Werte mit zunehmender Fipronil-Konzentration ab (Tab. 11), was darauf schließen lässt, dass die Mortalität in den Kombinationen geringer war als die in der Behandlung mit MA-K allein (Abb. 31). Die Mortalität in den Kombinationen war (tendenziell) höher als die in der DMSO-Kontrolle ($\chi^2 = 7,50$, $p = 0,006$ [MA-K + 0,064 ppm], $\chi^2 = 2,84$, $p = 0,092$ [MA-K + 0,32 ppm]). Das Chancenverhältnis zu DMSO war für die MA-K-Kombination mit 0,064 ppm höher als das von 0,064 ppm Fipronil allein. Die Kombination mit der höheren Fipronil-Konzentration hatte aber ein niedrigeres Chancenverhältnis als Fipronil allein (Tab. 11). Der Effekt der Kombination aus $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml und 0,064 ppm konnte als additiv eingestuft werden (Tab. 11).

3.3.3.1.2 MA-7 und Fipronil

Die Mortalität in den MA-7-Behandlungen unterschied sich nur in der Kombination von $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml und 0,064 ppm Fipronil von der in der Tween-Kontrolle ($\chi^2 = 4,37$, $p = 0,037$) (Abb. 32). Der χ^2 -Wert dieser Kombination war höher als der von MA-7 allein. Es gab aber keine Unterschiede zwischen der Mortalitäten in den beiden Kombinationen und der in der DMSO-Kontrolle ($\chi^2 \leq 2,03$, $p \geq 0,15$). Das Chancenverhältnis der Kombination aus MA-7 und 0,064 ppm war höher als das von 0,064 ppm allein, während das Chancenverhältnis der anderen Kombination geringer war als das der dazugehörigen Fipronil-Konzentration (0,32 ppm) (Tab. 11).

Es starb kein Männchen durch die Behandlung mit $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-7 (Abb. 32) und die Mortalität in den Kombinationen unterschied sich nur tendenziell von der in der Tween-Kontrolle ($\chi^2 = 3,11$, $p = 0,078$), während es zu der in der DMSO-Kontrolle keinen Unterschied gab ($\chi^2 = 1,06$, $p = 0,30$) (Tab. 11). Das Chancenverhältnis der Kombination aus $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml mit 0,064 ppm Fipronil war im Vergleich zu dem der Fipronil-Konzentration leicht höher, während die Kombination mit 0,32 ppm ein geringeres Chancenverhältnis als reines Fipronil (0,32 ppm) aufwies.

Die Kombination aus $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-K und 0,32 ppm Fipronil konnte mehr Männchen töten als die Kombination mit MA-7 ($\chi^2 = 3,95$, $p = 0,047$). Außerdem starben mehr Männchen nach Behandlung mit $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml MA-K allein als nach Behandlung mit MA-7 ($\chi^2 = 11,8$, $p = 0,001$). Alle anderen Behandlung mit MA-K oder MA-7 unterschieden sich jedoch nicht voneinander ($\chi^2 \leq 3,55$, $p \geq 0,06$).

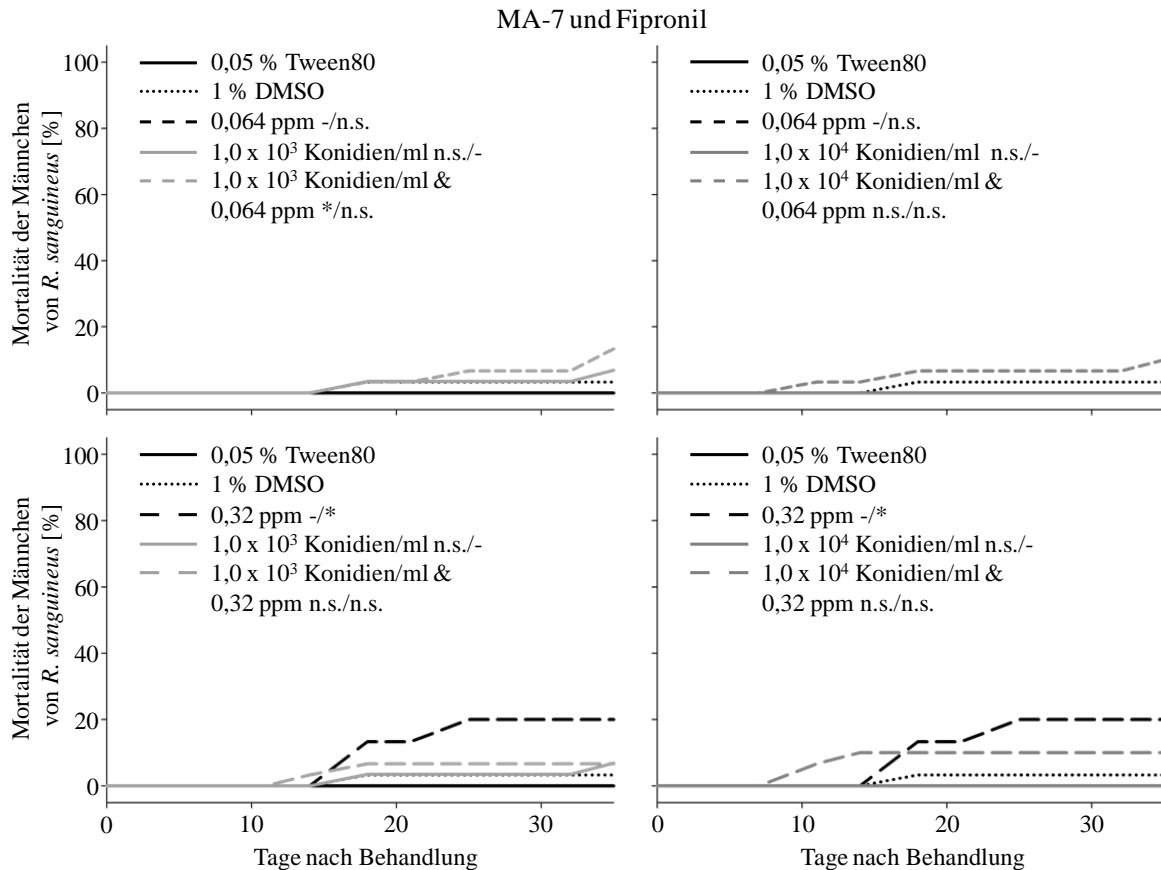


Abb. 32: Mortalität der ungesogenen Männchen von *R. sanguineus* über den Versuchszeitraum von 35 Tagen. Behandelt wurden die Männchen mit $1,0 \times 10^3$ oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-7 und mit 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO an (Log-Rang-Test mit $df = 1$) ($n = 30$).

3.3.3.2 Weibchen

Bei der Behandlung mit 0,05 % Tween80, 1 % DMSO, 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil starben innerhalb von 35 Tagen 0 % bis 15 % der Weibchen. Zwischen den Fipronil-Konzentrationen und der DMSO-Kontrolle gab es nur tendenzielle Unterschiede ($\chi^2 \leq 3,80$, $p \geq 0,051$).

3.3.3.2.1 MA-K und Fipronil

Die Konzentration von $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-K verursachte nur tendenziell eine höhere Mortalität als die Tween-Kontrolle ($\chi^2 = 3,08$, $p = 0,079$) (Abb. 33). Die Mortalität in den Kombinationen aus MA-K und Fipronil war weder höher als die in der Tween- noch als die in der DMSO-Behandlung ($\chi^2 \leq 2,02$, $p \geq 0,155$) (Tab. 12). Die Chancenverhältnisse waren für die Kombination mit 0,064 ppm größer als das für 0,064 ppm allein. Bei der höheren Fipronil-Konzentration war das Chancenverhältnis für die Kombination jedoch geringer als für Fipronil allein. Die höhere MA-K-Konzentration von $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml verursachte

Tab. 11: χ^2 - und p-Werte des Log-Rang-Tests (df = 1) zur Mortalität der ungesogenen Männchen von *R. sanguineus* und die Chancenverhältnisse (CV) der Behandlungen zu den Kontrollen. Behandelt wurden die Männchen mit $1,0 \times 10^3$ oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-K bzw. MA-7 und mit 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Zusätzlich wurde für Behandlungen, die signifikant unterschiedlich zur Kontrolle waren, eine erwartete Mortalität (M_E) und ein χ^2 -Wert ($\chi^2_{(E)}$) berechnet, um den auftretenden Effekt für die signifikanten Interaktionen in den Kombinationsvarianten zu bestimmen (n = 30).

Behandlung		Kontrolle	0,05 % Tween80			1 % DMSO			M_E	$\chi^2_{(E)}$	Effekt
			χ^2 -Wert	p-Wert	CV	χ^2 -Wert	p-Wert	CV			
Fipronil [ppm]		0,064				0,0	0,990	1,0			
		0,32				3,9	0,047	7,3			
MA-K	$1,0 \times 10^3$		2,1	0,147	-						
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^3$ &	0,064	5,5	0,021	-	2,9	0,090	5,8			
Fipronil [ppm]	$1,0 \times 10^3$ &	0,32	9,1	0,003	-	6,1	0,013	10,5	25,5	0,1	additiv
	$1,0 \times 10^4$		11,8	0,001	-						
	$1,0 \times 10^4$ &	0,064	10,5	0,001	-	7,5	0,006	12,4	35,6	0,9	additiv
	$1,0 \times 10^4$ &	0,32	5,4	0,021	-	2,8	0,092	5,8			
MA-7	$1,0 \times 10^3$		2,0	0,154	-						
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^3$ &	0,064	4,4	0,037	-	2,0	0,159	4,6			
Fipronil [ppm]	$1,0 \times 10^3$ &	0,32	2,0	0,154	-	0,4	0,548	2,1			
	$1,0 \times 10^4$		-	-	-						
	$1,0 \times 10^4$ &	0,064	3,1	0,078	-	1,1	0,303	3,2			
	$1,0 \times 10^4$ &	0,32	3,1	0,078	-	1,1	0,294	3,2			

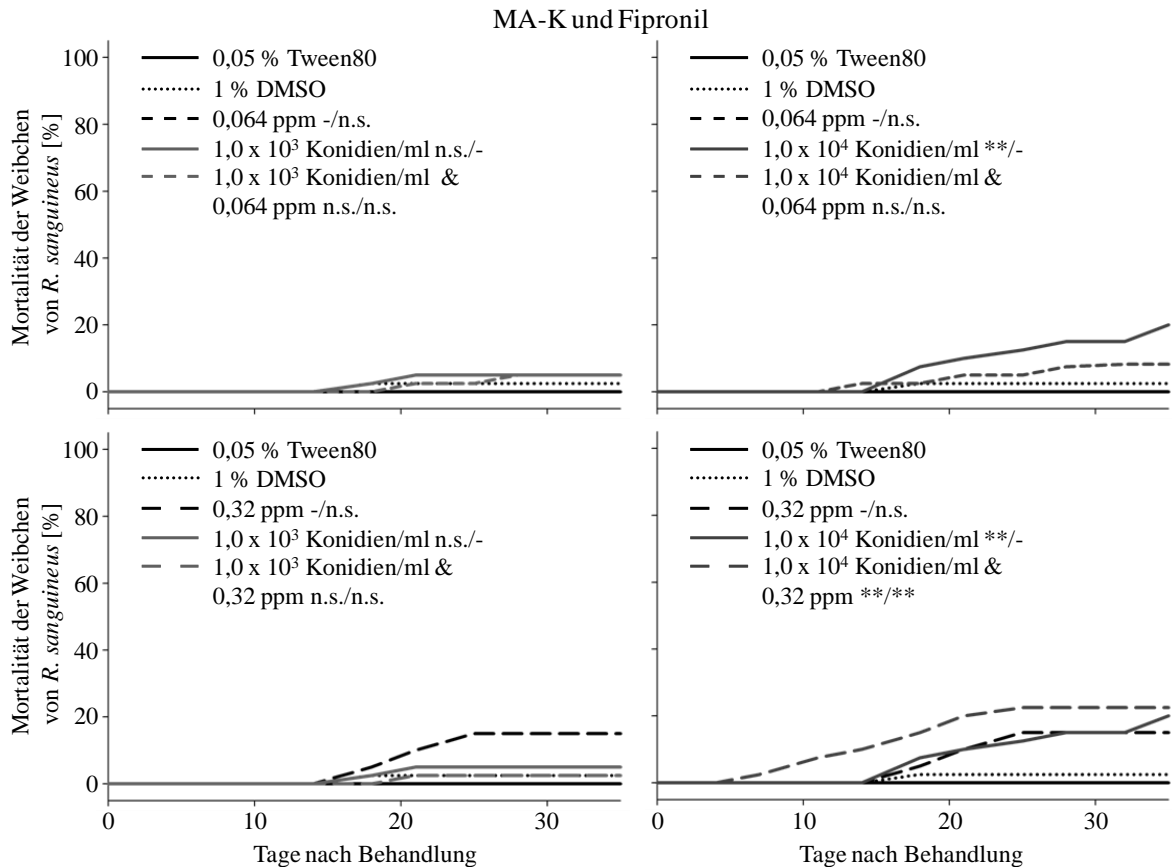


Abb. 33: Mortalität der ungesogenen Weibchen von *R. sanguineus* über den Versuchszeitraum von 35 Tagen. Behandelt wurden die Weibchen mit $1,0 \times 10^3$ oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-K und mit 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO an (Log-Rang-Test mit $df = 1$) ($n = 40$).

allein eine höhere Mortalität als Tween ($\chi^2 = 8,80$, $p = 0,003$). Auch die beiden Kombinationen verursachten eine (zumindest tendenziell) höhere Mortalität als Tween ($\chi^2 \geq 3,08$, $p \leq 0,079$) (Abb. 33). Es zeigte sich an den χ^2 -Werten, dass sich die Mortalität in der Kombination mit 0,064 ppm Fipronil gegenüber der Mortalität in der Behandlung mit MA-K verringerte. In der Kombination mit 0,32 ppm war sie hingegen höher als in der Behandlung mit MA-K. Allerdings war nur die Mortalität in der Kombination mit 0,32 ppm Fipronil auch höher als die in der DMSO-Kontrolle ($\chi^2 = 7,27$, $p = 0,007$). Das Chancenverhältnis der Kombination war auch deutlich höher als das Chancenverhältnis von 0,32 ppm Fipronil (Tab. 12).

3.3.3.2.2 MA-7 und Fipronil

Die niedrigste Konzentration von MA-7 ($1,0 \times 10^3$ Konidien/ml) verursachte allein keine Mortalität. In den Kombinationen aus $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml und Fipronil war die Mortalität

zwar tendenziell höher als in der Tween-Behandlung ($\chi^2 = 3,08$, $p = 0,079$), es gab aber keinen Unterschied zu der Mortalität in der DMSO-Kontrolle ($\chi^2 \leq 1,03$, $p \geq 0,31$) (Abb. 34). Die χ^2 -Werte der Kombinationen waren kleiner als der χ^2 -Wert von MA-7 allein (Tab. 12). Das Chancenverhältnis der Kombination aus $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml und 0,064 ppm Fipronil war größer als das von 0,064 ppm Fipronil allein. Für die andere Kombination war das Chancenverhältnis aber niedriger als das für 0,32 ppm.

Die Konzentration von $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml MA-7 verursachte sowohl allein als auch in Kombination eine höhere Mortalität als Tween ($\chi^2 \geq 5,41$, $p \leq 0,02$) (Abb. 34). Die χ^2 -Werte der Kombinationen waren höher als der χ^2 -Wert von MA-7 allein. Die Mortalität war in den Kombinationen auch höher als in der DMSO-Behandlung ($\chi^2 \geq 4,89$, $p \leq 0,027$). Die Chancenverhältnisse der Kombinationen zu DMSO waren für die Kombinationen auch deutlich höher als die der Fipronil-Konzentrationen. Es gab in beiden Konzentrationen einen additiven Effekt (Tab. 12).

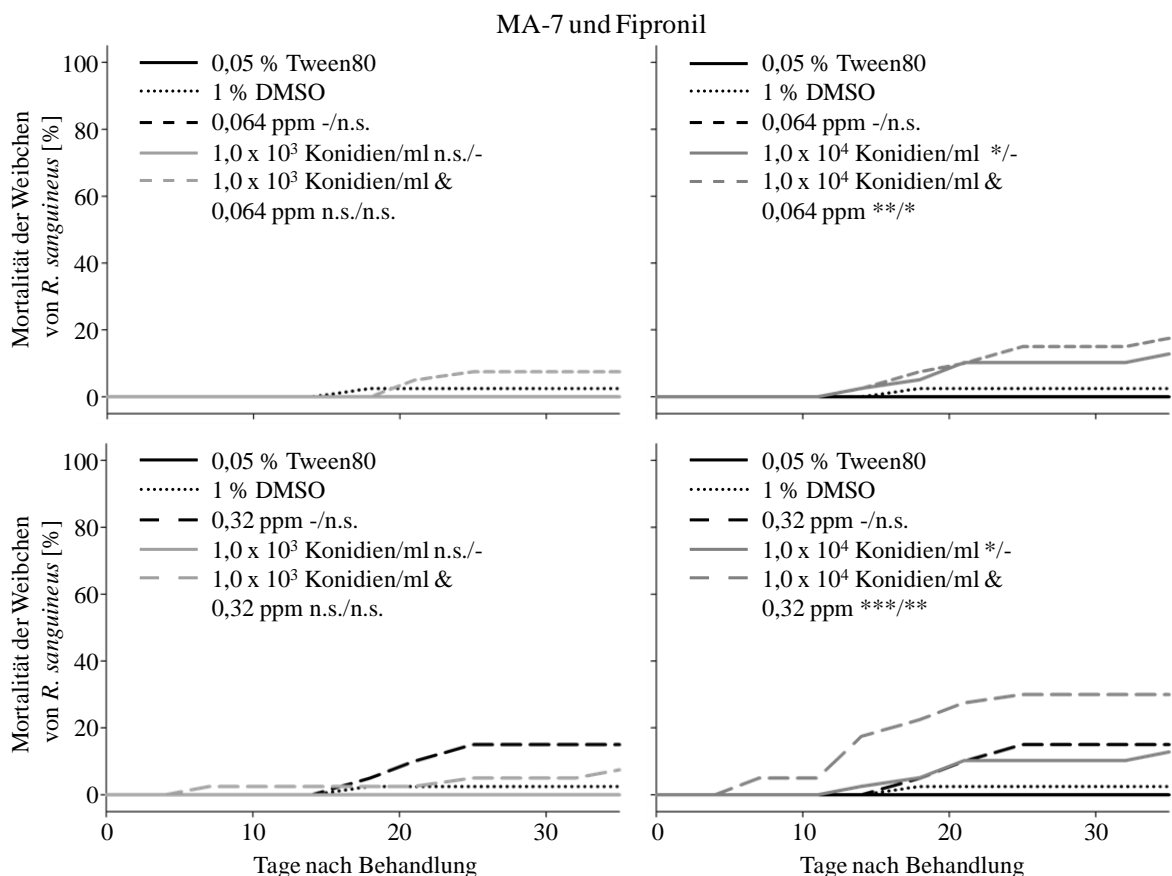


Abb. 34: Mortalität der ungesogenen Weibchen von *R. sanguineus* über den Versuchszeitraum von 35 Tagen. Behandelt wurden die Weibchen mit $1,0 \times 10^3$ oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-7 und mit 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO an (Log-Rang-Test mit $df = 1$) ($n = 40$).

Tab. 12: χ^2 - und p-Werte des Log-Rang-Tests (df = 1) zur Mortalität der ungesogenen Weibchen von *R. sanguineus* und die Chancenverhältnisse (CV) der Behandlungen zu den Kontrollen. Behandelt wurden die Weibchen mit $1,0 \times 10^3$ oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-K bzw. MA-7 und mit 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Zusätzlich wurde für Behandlungen, die signifikant unterschiedlich zur Kontrolle waren, eine erwartete Mortalität (M_E) und ein χ^2 -Wert ($\chi^2_{(E)}$) berechnet, um den auftretenden Effekt für die signifikanten Interaktionen in den Kombinationsvarianten zu bestimmen (n = 40).

Behandlung		Kontrolle	0,05 % Tween80			1 % DMSO			M_E	$\chi^2_{(E)}$	Effekt
			χ^2 -Wert	p-Wert	CV	χ^2 -Wert	p-Wert	CV			
Fipronil [ppm]		0,064				1,0	0,317	0,0			
		0,32				3,8	0,051	5,3			
MA-K	$1,0 \times 10^3$		3,1	0,079	-						
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^3$ &	0,064	2,0	0,155	-	0,3	0,569	2,1			
Fipronil [ppm]	$1,0 \times 10^3$ &	0,32	1,0	0,317	-	0,0	0,993	1,0			
	$1,0 \times 10^4$		8,8	0,003	-						
	$1,0 \times 10^4$ &	0,064	3,1	0,079	-	1,0	0,311	3,2			
	$1,0 \times 10^4$ &	0,32	10,0	0,002	-	7,3	0,007	11,3	32,0	2,8 additiv	
MA-7	$1,0 \times 10^3$		-	-	-						
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^3$ &	0,064	3,1	0,079	-	1,0	0,319	3,2			
Fipronil [ppm]	$1,0 \times 10^3$ &	0,32	3,1	0,079	-	1,0	0,311	3,2			
	$1,0 \times 10^4$		5,4	0,020	-						
	$1,0 \times 10^4$ &	0,064	7,6	0,006	-	4,5	0,027	8,8	12,8	1,7 additiv	
	$1,0 \times 10^4$ &	0,32	14,0	<0,001	-	11,1	0,001	16,7	25,9	0,7 additiv	

Es gab in den jeweiligen Behandlungen von MA-K und MA-7 bezüglich der Mortalität der Weibchen keine Unterschiede ($\chi^2 \leq 3,078$, $p \geq 0,079$).

In den meisten Behandlungen war die Mortalität der Männchen nicht unterschiedlich zu der der Weibchen ($\chi^2 \leq 3,65$, $p \geq 0,056$). Es starben aber mehr Weibchen als Männchen, wenn sie mit $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml MA-7 allein behandelt wurden ($\chi^2 = 4,06$, $p = 0,044$).

Bei den Behandlungen mit den Kombinationen aus $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-K und 0,32 ppm oder aus $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml MA-K und 0,064 ppm starben mehr Männchen als Weibchen ($\chi^2 \geq 6,12$, $p \leq 0,013$).

3.4 Diskussion

Die Zecke *R. sanguineus* ist ein Vektor zahlreicher Pathogene (Nicholson *et al.* 2009, Dantas-Torres 2008, Walker *et al.* 2000), weshalb eine Kontrolle erforderlich ist. Weiterhin induziert auch mehrmaliger Befall bei Hunden keine Immunität (Szabó und Bechara 1999, Theis und Budwiser 1974). Aus verschiedenen Gründen, u. a. Resistenzentwicklung (Castro-Janer *et al.* 2010), ist es erstrebenswert, die dafür aufgewendete Ektoparasitizidmenge mindestens zu reduzieren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Möglichkeit untersucht eine biologische Kontrolle mit *M. anisopliae* in Kombination mit niedrigen Konzentrationen synthetischer Schädlingsbekämpfungsmittel zu etablieren. Dazu war es nötig zunächst einmal die subletalen Konzentrationen von Schädlingsbekämpfungsmitteln (in diesem Fall von Fipronil) und die niedrigen Wirkungsgrade der *M. anisopliae*-Stämme zu ermitteln, um diese anschließend gemeinsam anzuwenden. Im Folgenden wird daher als Erstes auf die Ergebnisse der Dosis-Wirkungs-Versuche von Fipronil und der beiden Stämme (MA-K und MA-7) für *R. sanguineus* eingegangen. Anschließend werden die Wirkungen der Kombinationen vor dem Hintergrund anderer Studien diskutiert.

3.4.1 Subletale Konzentrationen von Fipronil

Der LC₅₀-Wert für Fipronil lag nach 14 Tagen für Männchen bei 1,14 ppm und für Weibchen bei 1,55 ppm. Die Unterschiede zwischen den Geschlechtern waren aber nicht signifikant. Einen ähnlichen LC₅₀-Wert (1,84 ppm) ermittelten Prullage *et al.* (2011) für Adulte von *R. sanguineus* bereits 48 Stunden nach Inkubationsstart in mit Fipronil beschichteten Gläschen. Bei Versuchen von de Oliveira Monteiro *et al.* (2009) führte das Tauchen von vollgesogenen Weibchen von *R. sanguineus* für zwei Minuten in 1 ppm Fipronil zu Veränderungen in den Ovarien, woraus sich bereits eine Wirkung dieser niedrigen Konzentration ableiten lässt. Die Ermittlung des LC₅₀-Wertes für vollgesogene Weibchen bei

gleicher Methodik ergab allerdings sieben Tage nach Behandlung einen deutlich höheren Wert von 9,647 ppm (4,711 - 13,470 ppm) (Oliveira *et al.* 2011). Miller *et al.* (2001) ermittelten mit Hilfe eines Kontakttests (im Englischen „larval package test“) für Larven von drei verschiedenen Stämmen von *R. sanguineus* nach 24 Stunden einen stammabhängigen LC₅₀-Wert von 0,038 ppm (0,034 – 0,042 ppm) bis 0,056 ppm (0,029 – 0,218 ppm). Koch und Burkwhat (1984) geben in ihrer Studie für *R. sanguineus* LC₅₀-Werte zwischen 27 und 260 ppm von Diazinon, Permethrin, Lindan und Carbaryl nach 24-stündiger Behandlung an. Verglichen damit ist die Wirkung von Fipronil als gut zu beurteilen, zumal die von Koch und Burkwhat (1984) getesteten Zecken innerhalb der 24 Stunden permanenten Kontakt mit den Wirkstoffen hatten, da sie in einem mit Wirkstoff beschichteten Gläschen inkubiert wurden. Beim Vergleich von LC₅₀-Werten für vollgesogene Weibchen von *R. sanguineus*, die mittels Tauchmethode gewonnen wurden, ergab sich ebenfalls, dass Permethrin (LC₅₀ = 2062 ppm [1549 – 2675 ppm]) deutlich schlechter wirkte (Roma *et al.* 2009). Es finden sich in der Literatur außerdem einige Untersuchungen zu den Kontrollerfolgen für *R. sanguineus* mit Fipronil am Wirt. In den meisten Studien wurde ein relativ schneller Wirkungseintritt (innerhalb von 48 Stunden) (Cruthers *et al.* 2001) und eine gute Wirksamkeit von Fipronil für circa drei bis vier Wochen nach Applikation gefunden (Dryden *et al.* 2006a, Estrada-Peña und Ascher 1999).

3.4.2 Konzentrationsabhängige Wirkungsgrade von MA-K und MA-7

Adulte von *R. sanguineus* wiesen eine hohe Sensitivität gegenüber beiden *M. anisopliae*-Stämmen auf. Es wurden LC₅₀-Werte zwischen $1,77 \times 10^4$ und $5,14 \times 10^4$ Konidien/ml für beide Geschlechter nach 28 Tagen Inkubation ermittelt. Hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber den beiden Pilzstämmen gab es bis auf eine Ausnahme keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern. Sowohl bei Samish *et al.* (2001) als auch bei Gindin *et al.* (2002) reagierten die ungesogenen Männchen von *R. sanguineus* gegenüber MA-7 tendenziell empfindlicher als die Weibchen. Auf zwei andere Stämme (43 und 108) reagierten beide Geschlechter aber gleich (Samish *et al.* 2001). Kirkland *et al.* (2004b) fanden bei ihren Versuchen mit Adulten von *R. sanguineus* aber auch keine unterschiedliche Empfindlichkeit der Geschlechter gegenüber dem *M. anisopliae*-Stamm ATCC 20500. Vergleichsweise geringe Mortalitäten stellten Samish *et al.* (2001) 21 Tage nach der Tauchbehandlung mit $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml MA-7 für Adulte *R. sanguineus* (zwischen 33 und 57 %) fest. Bei Gindin *et al.* (2002) wurde zwar eine etwas höhere Mortalität mit $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml MA-7 erzielt (40 – 80 %), allerdings liegen diese Mortalitäten immer noch unter denen, die in

der vorliegenden Studie beobachtet wurden (93 – 100 % Mortalität bei $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-7). Die in anderen Publikationen veröffentlichten Mortalitätsraten lagen aber auch deutlich unter den hier ermittelten. Der getestete *M. anisopliae*-Stamm ATCC 20500 erreichte 28 Tage nach Behandlung mit 10^8 Konidien/ml nur eine Mortalität adulter *R. sanguineus* von circa 40 ± 20 %. Auf Nymphen hatte dieser Stamm aber eine bessere Wirkung (100 % Mortalität) (Kirkland *et al.* 2004b). Es starben 65,25 % vollgesogener Weibchen von *R. sanguineus*, die mit einer $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml *M. anisopliae* (Ma959) Formulierung behandelt wurden (Reis *et al.* 2008). Polar *et al.* (2005) untersuchten die mittlere Überlebenszeit von vollgesogenen Weibchen und ungesogenen Larven von *R. sanguineus* nach Behandlung mit $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml und fanden, dass die mittlere Überlebenszeit durch Behandlung mit *M. anisopliae* (ARSEF3297) deutlich verkürzt wurde, während sich die Behandlung mit ARSEF3297 auf die Larven nicht auswirkte. Es trat aber nahezu eine Verdopplung der Schlupfzeitdauer der getesteten Eier nach Behandlung mit ARSEF3297 im Vergleich zur Kontrolle auf.

Als kritisch einzustufen ist die Dauer, die die beiden Stämme in den vorliegenden Versuchen brauchten, bis eine Infektion und schließlich der Tod der Zecken eintrat, auch wenn andere Stämme eine ähnliche Inkubationszeit benötigten (z. B. Kirkland *et al.* 2004b, Samish *et al.* 2001). Auch wenn der LC_{50} -Wert mit $1,77 \times 10^4$ bis $5,14 \times 10^4$ Konidien/ml relativ niedrig lag, so darf nicht außer Acht gelassen werden, dass diese Mortalität erst nach 28 Tagen erreicht wurde. Wird davon ausgegangen, dass eine spätere Anwendung von *M. anisopliae* am Wirt der Zecken erfolgen soll, so haben die Weibchen, deren Saugakt zwischen 6 und 19 Tagen dauert (Bechara *et al.* 1995, Pegram *et al.* 1987), genügend Zeit sich voll zu saugen und Krankheitserreger zu übertragen, ehe eine Infektion der Zecke durch *M. anisopliae* eintritt. Auch wenn durch eine Erhöhung der Konidien-Konzentration die Infektion etwas beschleunigt würde, reichte dieses immer noch nicht aus, um das Festsaugen am Wirt zu verhindern. Eine höhere Konzentration von *M. anisopliae* erhöhte allerdings auch die Chance, Nicht-Zielorganismen zu treffen. Ein kombinierter Einsatz von Schädlingsbekämpfungsmitteln und *M. anisopliae* könnte Abhilfe schaffen, da man von anderen Studien weiß, dass Schädlingsbekämpfungsmittel die Pathogenabwehr herabzusetzen vermögen (Hiromori und Nishigaki 2001, Hassan und Charnley 1989) oder das Verhalten der Zielorganismen zu beeinflussen (Moino Jr. und Alves 1998, Quintela und McCoy 1998a), so dass eine Infektion begünstigt und beschleunigt werden kann. Dabei sollten beide Stämme von *M. anisopliae* in Konzentrationen eingesetzt werden, in denen sie Nicht-Zielorganismen nicht belasten.

3.4.3 Kombinationen aus *M. anisopliae* und Fipronil

Grundsätzlich konnten in den vorliegenden Kombinationsstudien MA-K- bzw. MA-7-Konzentrationen, die in den Dosis-Wirkungs-Versuchen Mortalitäten von bis zu 50 % erzielten, in den Kombinationsversuchen allein nicht mehr als 33 % bzw. 20 % der Männchen bzw. Weibchen innerhalb von 35 Tagen abtöten. Damit wirkten beide Stämme also deutlich schlechter als nach den Ergebnissen der Dosis-Wirkungs-Versuche erwartet. Diese Werte stehen in Übereinstimmung mit Daten aus anderen Studien (Kirkland *et al.* 2004b, Gindin *et al.* 2002, Samish *et al.* 2001). Warum es in diesen Versuchen zwischen den Geschlechtern teilweise Unterschiede hinsichtlich der Stammempfindlichkeit gab, ist unklar. Die Weibchen waren in den Kombinationsstudien empfindlicher gegenüber MA-7, während die Männchen auf MA-K empfindlicher reagierten. Ein möglicher Einflussfaktor auf die Vitalität der Zecken ist die Physiologie des Wirtstieres, z. B. ist die Gewichtszunahme der Zecken, die an einem resistenten Wirt saugen, geringer als die, die an einem empfindlichen Wirt saugen (Latif 1984, Randolph 1979). Ebenso gut ist es möglich, dass die in diesem Versuch benutzten Pilze eine leicht veränderte Virulenz gegenüber den Pilzen aus den vorherigen Versuchen aufwiesen, was für die vorliegenden Ergebnisse verantwortlich sein könnte.

Die Effekte aller Kombinationen von *M. anisopliae* und Fipronil, die eine höhere Mortalität als die von Tween und DMSO verursachten, ließen sich als additiv einstufen. Die Mortalität in den Kombinationsbehandlungen setzte bei den Männchen und zum Teil auch bei den Weibchen früher ein als in den Behandlungen mit *M. anisopliae*. Kombinationsstudien mit entomopathogenen Pilzen und Schädlingsbekämpfungsmitteln wurden an Zecken bislang nur mit Pyrethroiden durchgeführt. So verursachte die kombinierte Anwendung von *M. anisopliae* ($1,0 \times 10^7$ und $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml) mit Permethrin (0,025 bis 0,25 ppm) gegen *Ixodes scapularis* im Unterschied zur Einzelanwendung von Pilz und Permethrin eine erhöhte Mortalität, die allerdings nur als additiv eingestuft wurde (Hornbostel *et al.* 2005). Beim Einsatz von *Beauveria bassiana* ($1,0 \times 10^8$ Konidien/ml) mit unterschiedlichen Konzentrationen von Deltamethrin (0,25 bis 2500 ppm) gegen die Zecke *Hyalomma [anatolicum] anatolicum* wurde für alle Kombinationsvarianten eine höhere Mortalität und ein schnellerer Wirkungseintritt erzielt (Sun *et al.* 2011). Kombinationsstudien mit Stoffen aus der Wirkstoffklasse von Fipronil wurden bislang nur an Insekten durchgeführt. Die Effekte dieser zur Gruppe der GABAergen Chloridkanal-Antagonisten gehörenden Stoffe sind leicht antagonistisch bis synergistisch. Dayakar *et al.* (2001) fanden synergistische Effekte bei der kombinierten Anwendung von Endosulfan und *B. bassiana* bzw.

M. anisopliae gegen *Spodoptera litura*. Die Virulenz von *M. anisopliae* konnte dabei in Kombination mit Endosulfan um das 1,24-fache gesteigert werden. In einer anderen Studie gab es aber nach Behandlung von *Spilarctia obliqua* mit der Kombination von Endosulfan und *B. bassiana* oder *M. anisopliae* keine Unterschiede in der Mortalität zwischen der Kombination und der Endosulfan-Konzentration (Purwar und Sachan 2006). Moino Jr. und Alves (1998) kamen zu dem Ergebnis, dass Fipronil für eine kombinierte Anwendung mit *M. anisopliae* gegen die Termitenart *Heterotermes tenuis* nicht geeignet sei, da Fipronil das Putzverhalten nicht beeinträchtigte und damit nicht als Stressor fungierte. Die Empfindlichkeit verschiedener Pilzstämme einer Spezies gegenüber Schädlingsbekämpfungsmitteln kann stark schwanken (z. B. Batista Filho *et al.* 2001, Neves *et al.* 2001, Moino Jr. und Alves 1998, Olmert und Kenneth 1974), so dass ein Effekt, der für andere *M. anisopliae*-Stämme gefunden wurde, nicht zwangsläufig auch für MA-K oder MA-7 zutreffen muss. Des Weiteren deuten sowohl die Ergebnisse von Gindin *et al.* (2002) und Samish *et al.* (2001), aber auch die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Dosis-Wirkungs- und der Kombinations-Versuche darauf hin, dass selbst innerhalb eines Pilzstammes unterschiedliche Virulenzen auftreten. Für eine weitere Nutzung von MA-7 und MA-K als zuverlässige Kontrolloption ist eine Stabilisierung der Virulenz demnach unerlässlich. Anscheinend ist dies aber nicht allein über den Zusatz von Schädlingsbekämpfungsmitteln möglich. Stattdessen sollte man nach einer geeigneten Formulierung suchen und für weitere Versuche auf eine Standardisierung des Pilzinokulums (z. B. Alter der Konidien) achten.

3.4.4 Fazit

Aufgrund der gefundenen additiven Effekte von *M. anisopliae* in Kombination mit Fipronil ist es möglich, beide zusammen gegen *R. sanguineus* anzuwenden, um so zumindest die Menge der einzusetzenden Schädlingsbekämpfungsmittel zu minimieren und das sekundäre Verbreitungspotenzial von *M. anisopliae* zu nutzen. Dazu sind aber weitere Studien erforderlich, die die konzentrationsabhängige Veränderung der Effekte von Schädlingsbekämpfungsmitteln auf die Stämme von *M. anisopliae* untersuchen, um die kombinierten Präparate dann *in vivo* anzuwenden.

Kapitel 4: Möglichkeiten der Bekämpfung verschiedener Entwicklungsstadien von *Rhipicephalus microplus* durch Kombinationen von *Metarhizium anisopliae* und Schädlingsbekämpfungsmitteln

Zusammenfassung

Die südliche Rinderzecke *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* kommt in den Tropen und Subtropen vor und ist ein steno- und homoxener Parasit, der hauptsächlich Rinder befällt. Durch erhebliche Zeckeninfestationen und die Übertragung von Krankheitserregern kann ein beträchtlicher ökonomischer Schaden entstehen, weshalb eine Bekämpfung der Zeckenpopulation notwendig ist. Aufgrund von Resistenzen und möglichen Kontaminationen von Tier und Umwelt wird zunehmend nach biologischen Alternativen zu chemischen Ektoparasitiziden gesucht.

Metarhizium anisopliae, aus der Gruppe der entomopathogenen Pilze, hat trotz zahlreicher Vorteile als Zeckenbekämpfungsmittel (u.a. Potenzial zu Epizootien, geringe Wirkung auf Nicht-Zielorganismen) einen entscheidenden Nachteil: Die Wirksamkeit variiert, beeinflusst u. a. von Umweltbedingungen und der Zusammensetzung der Zeckenkutikula, stark. Um *M. anisopliae* als wirksames biologisches Schädlingsbekämpfungsmittel einsetzen zu können, muss die Wirkung verlässlich sein. Ein kombinierter Einsatz von *M. anisopliae* und niedrig dosierten Schädlingsbekämpfungsmitteln könnte die Wirksamkeit durch die Unterdrückung der Immunantwort der Zecken erhöhen.

In der vorliegenden Studie wurde die Empfindlichkeit von vollgesogenen Weibchen, Eiern und ungesogenen Larven von *R. microplus* auf ausgewählte Schädlingsbekämpfungsmittel und die beiden Pilzstämme MA-K und MA-7 *in vitro* untersucht. Zunächst wurden LC₅₀-Werte für die Schädlingsbekämpfungsmittel und die Abhängigkeit der Wirkungsgrade der *M. anisopliae*-Stämme von der Konzentration applizierter Sporensuspensionen ermittelt. Die Stadien wurden dazu mittels einer Tauchmethode mit verschiedenen Wirkstoffen oder MA-K bzw. MA-7 behandelt und anschließend für 14 Tage (Adulte), 14 – 28 Tage (Larven) oder 42 Tage (Eier) in Petrischalen/Gläschen inkubiert und die Mortalität in den einzelnen Behandlungen wurde aufgezeichnet. Die ermittelten subletalen Konzentrationen von den Schädlingsbekämpfungsmitteln und MA-K bzw. MA-7 wurden im nächsten Schritt kombiniert angewendet und die Mortalität wurde dabei über die oben genannten Zeiträume bestimmt.

Bei den Weibchen erwiesen sich die Kombinationen aus $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-7 und 0,32 bzw. 1,6 ppm Amitraz als synergistisch. Es zeichnete sich eine früher einsetzende und

höhere Mortalität in diesen Kombinationen ab. Nur drei Kombinationen ($1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K mit 0,064 ppm Fipronil oder 1,6 ppm Amitraz und $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml MA-7 mit 0,32 ppm Fipronil) waren antagonistisch. Die Effekte aller anderen Kombinationen mit MA-K oder MA-7 waren additiv. Nach Behandlung der Weibchen mit $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml MA-7 und 1,6 ppm Amitraz wurde die Schlupfrate der Larven signifikant verringert.

In den Larventests ließen sich nur für die Kombination aus MA-K und der höheren Fipronil-Konzentration (0,064 ppm) synergistische Effekte nachweisen. Bei allen anderen Kombinationen mit Fipronil (0,0128 ppm), Amitraz (0,0128 und 0,064 ppm), Permethrin (8 und 40 ppm) oder Imidacloprid (40 und 200 ppm) konnten keine Kombinationseffekte nachgewiesen werden.

Die ermittelten Konzentrationen der Pilzstämmen mit geringem Wirkungsgrad ($1,0 \times 10^2$ - $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml) erwiesen sich in den Kombinationsversuchen mit Fipronil (0,064 und 0,32 ppm), Amitraz (0,0128 und 0,064 ppm) oder Permethrin (40 ppm) als zu gering, so dass keine eindeutigen Aussagen zur Wirksamkeit der kombinierten Anwendung an Eiern getroffen werden konnten.

Eine kombinierte Anwendung von *M. anisopliae* mit Fipronil oder Amitraz ist vor allem für vollgesogene Weibchen von *R. microplus* in ausgewählten Kombinationen in der Lage, die Wirkung des Pilzes zu erhöhen. Es sind weitere Studien erforderlich, um die Wirkung der Pilze zu stabilisieren.

Keywords: *Rhipicephalus microplus*, *Metarhizium anisopliae*, niedrig dosierte Schädlingsbekämpfungsmittel, additive Effekte, biologische Zeckenkontrolle

4.1 Einleitung

Die südliche Rinderzecke *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Canestrini, 1887 (Acari: Ixodidae) gehört mit vier weiteren Arten der Subgattung *Boophilus* an. Sie gilt als bedeutendste Nutztierzecke weltweit, obwohl sie nur in den Tropen und Subtropen vorkommt (Khan 2010, Nicholson *et al.* 2009). *R. microplus* ist ein stenoxener Parasit, dessen Hauptwirt Rinder sind (Hagen 1997), der aber auch andere Säugetiere (vornehmlich Huftiere) befällt (Eckert *et al.* 2008). *R. microplus* kann *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* (Erreger der „Rindermalaria“) und *Anaplasma marginale* (Erreger der Anaplasmosen) übertragen. Durch die zum Teil erhebliche Zeckeninfestation und die Übertragung der Krankheitserreger kann ein beträchtlicher ökonomischer Schaden infolge der verringerten Gewichtszunahme und Milchproduktion, der Zerstörung der Haut (des Leders) oder des Wirtstiertodes entstehen (Eckert *et al.* 2008, Peter *et al.* 2005, Sonenshine 1993).

Rinderzecken sind das ganze Jahr über aktiv (Beugnet und Chardonnet 1995). Der Lebenszyklus kann unter günstigen Bedingungen innerhalb von drei bis vier Wochen beendet werden (Khan 2010). Somit können innerhalb eines Jahres fünf bis sechs Generationen auftreten, was zu einer enormen Belastung für die befallenen Rinder werden kann (Eckert *et al.* 2008). Die einwirtige (homoxene) Zecke hat nur zwei Stadien, die zeitweise nicht auf dem Wirt leben: Zum einen frischgeschlüpfte Larven auf Wirtssuche und zum anderen vollgesogene Weibchen, die sich vom Wirt fallen lassen, um an einem geschützten Ort Eier abzulegen. Bei günstigen Umweltbedingungen, wie z. B. im Sommer, dauert die Präoviposition zwei bis sechs Tage (Nuñez *et al.* 1985). In der ein bis zwei Wochen dauernden Eiablagephase legt ein Weibchen durchschnittlich 2000 Eier (Eckert *et al.* 2008, Wilson 1978), maximal jedoch 4500 Eier (Nuñez *et al.* 1985). Das Weibchen stirbt nach der Eiablage. Nach einer Entwicklungsdauer von circa 21 bis 27 Tagen bei 26 °C und 80 % relative Luftfeuchte schlüpfen die Larven aus den Eiern (Alvarado und Gonzalez 1979) und begeben sich direkt auf Wirtssuche. Dazu klettern sie auf Grasshalme („questing“) (Nuñez *et al.* 1985, Wilkinson 1953). Die Larven orientieren sich nicht nur an Duftstoffen, sondern reagieren auch auf Schallfrequenzen zwischen 80 und 800 Hz, welche von fressenden Rindern emittiert werden sowie Schatten (Wallade und Rice 1982). Sobald die Larve einen geeigneten Wirt gefunden hat, beginnt die parasitische Phase (Nuñez *et al.* 1985). Bis zum Abfallen vollgesogener Weibchen dauert die Entwicklung circa 20 bis 41 Tage (Nuñez *et al.* 1972). Die Saugaktivitäten unterliegen bei *R. microplus* einem circadianen Rhythmus. Die größte Saugaktivität findet nachts statt, auch bei der finalen Blutaufnahme nach der Paarung, was zu

einem Abfallen am frühen Morgen führt (z. B. Nuñez *et al.* 1985, Wharton und Roulston 1970).

Zur Bekämpfung der Rinderzecke wurde und wird immer noch hauptsächlich mit Ektoparasitiziden gearbeitet (u. a. George *et al.* 2004 und George *et al.* 1998, Aguirre *et al.* 2000). Aufgrund der hohen Generationszahl pro Jahr haben sich aber bereits weltweit Resistenzen gegen viele Wirkstoffe (u. a. Pyrethroide) ausgebildet (z. B. Castro-Janer *et al.* 2010, Fernandes 2001). Außerdem kann die Anwendung von Akariziden zur Kontamination von Lebensmitteln, aber auch der Umwelt, führen (Willadsen 2006). Daher wird nach Alternativen gesucht, zu denen u. a. die Nutzung von resistenten Rinderarten, Pheromonfallen, Impfungen und der Einsatz von biologischen Agenzien gehören (de la Fuente und Kocan 2006, Samish 2000, Norval *et al.* 1996a, Norval *et al.* 1996b, Rechav *et al.* 1991).

Eine vielversprechende Möglichkeit der Kontrolle mit biologischen Agenzien sind entomopathogene Pilze, u. a. *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883 (Hypocreales: Clavicipitaceae), mit denen auch bereits einige Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen an *Rhipicephalus (Boophilus) sp.* durchgeführt wurden (z. B. Leemon und Jonsson 2008, Fernandes *et al.* 2004, Gindin *et al.* 2001). Auch wenn einige der genannten Studien gute Resultate erzielten, bleibt ein Problem der relativ langsame Infektionsprozess von zwei bis acht Tagen (Alves 1998), der zu langsam für eine ausreichende Kontrolle ist. Durch die Zugabe subletaler Konzentrationen eines Schädlingsbekämpfungsmittels könnte dieser Prozess durch Unterdrückung der Immunantwort beschleunigt werden, wie vergleichbare Studien mit anderen Organismen gezeigt haben (Hassan und Charnley 1989, Hiromori und Nishigaki 2001). Dabei sollten die negativen Effekte von Schädlingsbekämpfungsmitteln (Resistenzentwicklung, Effekte auf Nicht-Zielorganismen) aufgrund der geringen Dosierung vermieden werden können. Als mögliche Substanz für eine Kombination wurde Fipronil gewählt, da es eine schnelle Kontakt- und eine langanhaltende Residualwirkung hat (Blagburn und Lindsay 2001, Wiedemann 2000) und für Vertebraten weitestgehend ungefährlich ist (Ungemach 2010, Kunkle 1997). Da Fipronil zur Anwendung an Rindern nicht überall (u. a. Israel) zugelassen ist (Samish, persönliche Mitteilung), wurde zusätzlich Amitraz in die vorliegende Studie mit einbezogen. Es hat eine hohe Effektivität gegen Ektoparasiten und verfügt über eine repellente Wirkung (Ungemach 2010, Gupta 2007). Die Toxizität für Menschen und Rinder ist relativ gering (Jonsson und Hope 2007). Vor der Kombination mit *M. anisopliae* wurden die Schädlingsbekämpfungsmittel auf Kompatibilität mit den *M. anisopliae*-Stämmen getestet (Kapitel 1). Die Behandlung erfolgte

an allen Zeckenstadien, die nicht am Wirt leben (vollgesogene Weibchen, Eier und ungesogene Larven). Weibchen wurden dabei nur mit Amitraz oder Fipronil behandelt, während Eier und Larven auch mit Permethrin, Imidacloprid und NeemAzal[®] behandelt wurden. Zunächst wurden von den Schädlingsbekämpfungsmitteln subletale Konzentrationen und von den beiden *M. anisopliae*-Stämmen Konzentrationen mit geringem Wirkungsgrad ermittelt. Diese ermittelten Konzentrationen wurden dann in einem nächsten Schritt als Kombinationen getestet.

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Handhabung der Zecken

Die vollgesogenen Weibchen von *R. microplus* wurden von der Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen zur Verfügung gestellt. Gefüttert wurden die Zecken dort an Rindern. Dazu wurden ungesogene Larven circa zwei Wochen nach ihrem Schlupf auf der Rückenlinie von Rindern verteilt. Bei Raumtemperatur und Raumluftfeuchte fielen nach etwa 24 Tagen vollgesogene Weibchen ab. Nach dem Abfallen wurden diese versendet und kamen ein bis zwei Tage später am Versuchsort an. Sie wurden entweder sofort oder spätestens zwei Tage nach Erhalt getestet. Bei späterer Versuchsdurchführung wurden die Zecken bei 14 °C aufbewahrt. Am Versuchstag wurde gewartet, bis die Zecken auf Zimmertemperatur erwärmt waren.

Zur Gewinnung von Eiern und Larven wurde ein Teil der Weibchen bei 23 ± 2 °C und 75 % relativer Luftfeuchte gehalten. Für die Tests an Eiern wurden Eier verwendet, die innerhalb einer Woche nach Beginn der Eiablage gelegt wurden. Ein Teil der gelegten Eier wurde bei 23 ± 2 °C und 75 % relativer Luftfeuchte inkubiert, bis nach circa vier Wochen Larven geschlüpft waren. Es wurde circa zwei Wochen gewartet, bevor diese Larven getestet wurden.

4.2.2 Ermittlung der subletalen/subeffektiven Konzentrationen der Schädlingsbekämpfungsmittel

Es wurden Amitraz und Fipronil (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) für alle drei Stadien verwendet. Des Weiteren wurden Eier und Larven noch auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Permethrin, Imidacloprid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und NeemAzal (Trifolio-M GmbH, Lahnau) getestet. Die getesteten Präparate lagen als Reinstoffe in Pulverform vor. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften wurden die höchste Amitraz- und Fipronil-Konzentration (1000 ppm für vollgesogene Weibchen) mit 5 % Dimethylsulfoxid (DMSO) (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) in eine wässrige Lösung

gebracht. Da 5 % DMSO bei Versuchen mit Eiern oder Larven zu einer erhöhten Mortalität führte, wurde die höchste Konzentration der verschiedenen Schädlingsbekämpfungsmittel mit 1 % DMSO in eine wässrige Lösung gebracht. Der DMSO-Anteil in den übrigen Schädlingsbekämpfungsmittel-Ansätzen nahm jeweils um den Faktor fünf ab. Zur Ermittlung der subletalen Dosen von Amitraz und Fipronil für vollgesogene Weibchen wurden die Zecken mittels einer Tauchmethode behandelt. Es wurden 16 ml von je sieben Konzentrationen von Amitraz und Fipronil (von 0,064 bis 1000 ppm) getestet. Als Kontrolle diente 5 % DMSO. Die Versuche mit Amitraz und Fipronil wurden für Adulte dreimal mit je 25 Tieren je Testsubstanz wiederholt. Für die Eier und Larven wurde ein Diptest, nach Fernandes *et al.* (2004), angewendet. Dazu wurde von jedem oben genannten Schädlingsbekämpfungsmittel 1 ml in verschiedenen Konzentrationen (je nach Mittel und Stadium zwischen 0,0128 ppm und 5000 ppm) getestet. Als Kontrolle diente 1 % DMSO. Es wurden für Eier drei Versuche mit je vier Wiederholungen und für Larven zwei bis drei Versuche mit je drei bis vier Wiederholungen durchgeführt.

4.2.3 Ermittlung der konzentrationsabhängigen Wirkungsgrade von MA-K und MA-7

Es wurden die *M. anisopliae*-Stämme MA-K und MA-7 verwendet. Beide Stämme wurden zwei bis drei Wochen lang auf Kartoffel-Dextrose-Agar (39,5 g/l), der mit Hefeextrakt (5 g/l) und Pepton (5 g/l) angereichert wurde, in einer Klimakammer bei 25 ± 1 °C und einer Licht-Dunkel-Periode von 16 Stunden zu 8 Stunden angezogen. Die Konidien wurden abgeerntet und in sterilem mit 0,05 % Tween[®]80 (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) versetztem *Aq. dest.* suspendiert. Um zu untersuchen, ob es in Kombinationen mit den Schädlingsbekämpfungsmitteln zu einer Wirkungsstabilisierung oder -steigerung der *M. anisopliae*-Stämme kommen kann, muss mit Konzentrationen (\sim LC₅₀) gearbeitet werden, bei denen es möglich ist, einen Effekt der Schädlingsbekämpfungsmittel festzustellen. Zur Bestimmung dieser Konzentration mit geringem Wirkungsgrad für die Weibchen wurden 15 ml einer Konidiensuspension ($1,0 \times 10^3$ bis $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml) mittels der Tauchmethode verwendet. 0,05 % Tween80 diente als Kontrolle. Die Pilzkonzentrationstests wurden dreimal mit je 20 Tieren je Testsubstanz wiederholt. Für die Eier und Larven wurde ein Diptest, der an die Methode von Fernandes *et al.* (2004) angelehnt ist, angewendet. Dazu wurde 1 ml von jeder Konzentration ($1,0 \times 10^1$ bis $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml) getestet. Als Kontrolle diente 0,05 % Tween80. Es wurden für Eier drei Versuche mit je vier Wiederholungen und für Larven drei Versuche mit je drei bis vier Wiederholungen durchgeführt.

4.2.4 Versuche mit den Kombinationen aus *M. anisopliae* und Schädlingsbekämpfungsmitteln

In einem weiteren Schritt wurden die subletalen Konzentrationen der Schädlingsbekämpfungsmittel und die Konzentrationen mit geringem Wirkungsgrad der beiden *M. anisopliae*-Stämme kombiniert. Anwendung fand auch hier die Tauchmethode, wobei pro Testsubstanz (allein oder in Kombination) 15 ml für die Weibchen zum Tauchen verwendet wurden. Die Kombinationen enthielten 0,15 ml DMSO, in dem die Schädlingsbekämpfungsmittel gelöst wurden, und 14,85 ml 0,05 % Tween80, in dem die Konidien/ml von *M. anisopliae* suspendiert waren. Für die Eier und Larven wurde je 1 ml zum Dippen verwendet. Eine Übersicht über die Testkombinationen für die einzelnen Stadien findet sich in Tabelle 13. Die verwendeten Konzentrationen der Schädlingsbekämpfungsmittel und von *M. anisopliae* wurden jeweils auch einzeln getestet. Bei allen Versuchen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO als Kontrollen. Die Kombinationsversuche wurden für Weibchen dreimal (zweimal mit 20 und einmal mit 15 Weibchen je Testsubstanz) wiederholt. Für die Eier wurden vier Wiederholungen und für die Larven sechs Wiederholungen durchgeführt.

4.2.5 Kalibrierkurven

Zur Bestimmung der Anzahl der gelegten Eier wurden verschieden schwere Eipakete erst mit einer Feinwaage (Analytic A200S, Sartorius, Göttingen) gewogen und anschließend die Anzahl der Eier mit Hilfe eines Stereomikroskops ausgezählt. Aus den gewonnenen Daten wurde eine Kalibrierkurve erstellt (Abb. 35). Nachfolgend wurde die Anzahl der Eier (A_E) über das Gewicht (G_E) mit folgender Formel berechnet:

$$A_E = 22,428 \times G_E$$

Tab. 13: Kombinationen aus *M. anisopliae* und Schädlingsbekämpfungsmitteln für die Kombinationsversuche mit Weibchen (W), Eiern (E) und Larven (L) von *R. microplus*.

[Konidien/ml] \ [ppm]		Fipronil				Amitraz				Permethrin		Imidacloprid	
		0,0128	0,064	0,32	1,6	0,0128	0,064	0,32	1,6	8	40	40	200
MA-7	1,0 x 10 ²	-	-	E	E	E	E	-	-	-	E	-	-
	1,0 x 10 ³	-	-	E	E	E	E	-	-	-	E	-	-
MA-K und MA-7	1,0 x 10 ⁵	L	L	E*	E*	E*/L	E*/L	-	-	L	E*/L	L	L
	1,0 x 10 ⁶	L	L/W	E*/W	E*	E*/L	E*/L	W	W	L	E*/L	L	L
	1,0 x 10 ⁷	-	W	W	-	-	-	W	W	-	-	-	-
	1,0 x 10 ⁸	-	W	W	-	-	-	W	W	-	-	-	-

* Stadien wurden in diesen Kombinationen nur mit MA-K behandelt.

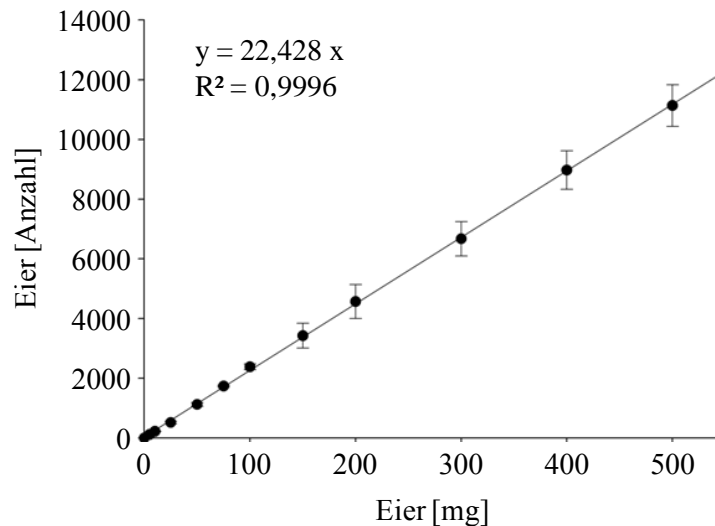


Abb. 35: Kalibrierkurve zum Verhältnis vom Gewicht der Eipakete zur Anzahl der Eier von *R. microplus*.

Zur Bestimmung der Anzahl der Larven wurden Gläschen mit den geschlüpften Larven eingefroren, dann für 48 Stunden in einem Trockenschrank (Typ UNB 400, Memmert, Schwabach) bei 55°C getrocknet und danach für fünf Tage in einen Exsikkator überführt. Nach ausreichender Trocknung wurde das Trockengewicht der geschlüpften Larven (G_L) mit einer Feinwaage bestimmt und mit den Daten eine Kalibrierkurve erstellt (Abb. 36). Nachfolgend wurde die Anzahl der Larven (A_L) mit Hilfe des Trockengewichts (G_L) mit folgender Formel berechnet:

$$A_L = 107,54 \times G_L$$

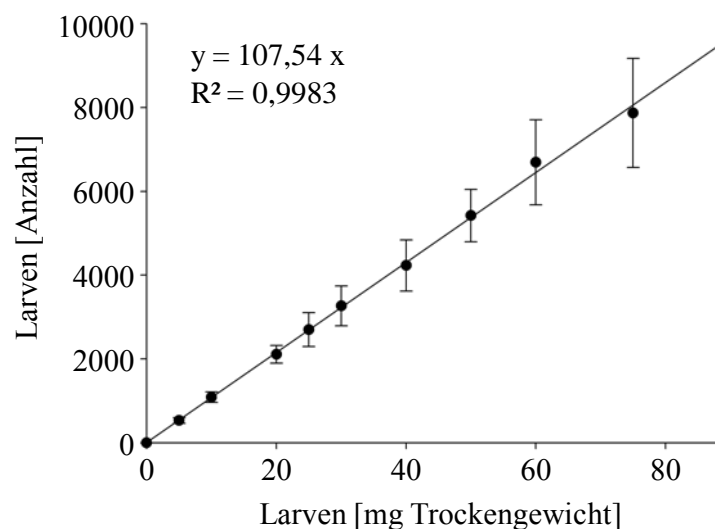


Abb. 36: Kalibrierkurve zum Verhältnis vom Trockengewicht der Larven von *R. microplus* zu ihrer Anzahl.

4.2.6 Behandlung und Inkubation

4.2.6.1 Vollgesogene Weibchen

Vollgesogene Weibchen wurden für 60 Sekunden in eine Testsuspension getaucht. Nach dem Abtrocknen wurden die Zecken einzeln auf mit 0,3 ml sterilem *Aq. dest.* angefeuchtetem Filterpapier in Petrischalen gesetzt. Die Petrischalen wurden mit Parafilm verschlossen und je 16 Petrischalen wurden auf ein mit 10 ml Wasser angefeuchtetes Tuch in eine Bellaplast-Schale (Rausch Verpackung GmbH, Augsburg) gestellt. Die Schalen wurden mit einem Deckel verschlossen und bei 23 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchte von 75 % im Dunkeln in einer Klimakammer inkubiert. Die Anzahl der toten Adulten wurde ab dem vierten Behandlungstag täglich zehn Tage lang mit Hilfe eines Stereomikroskops kontrolliert. Nach 14 Tagen wurden die gelegten Eier mit einer Waage (Handy H160, Sartorius, Göttingen) gewogen. Danach wurden sie in Rollrandgläser (10 ml, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) überführt, diese mit Gazedeckeln verschlossen und auf ein mit 10 ml Wasser angefeuchtetes Tuch in eine Bellaplast-Schale (Rausch Verpackung GmbH, Augsburg) gestellt. Die Schalen wurden mit einem Deckel verschlossen und bei 23 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchte von 75 % im Dunkeln in einer Klimakammer inkubiert. Nach dem Schlupf wurden die Larven, wie im Abschnitt 4.2.5 *Kalibrierkurven* beschrieben, behandelt und mit der ermittelten Anzahl von Larven- (A_L) und Eiern (A_E) wurde die Schlupfrate (SR) mit folgender Formel berechnet:

$$SR = \frac{A_L \times 100}{A_E}$$

4.2.6.2 Eier

Zur Untersuchung der Effekte von Schädlingsbekämpfungsmitteln und *M. anisopliae* allein und in Kombination auf Eier wurde ein Eipaket von 50 mg in ein Rollrandglas überführt. Es wurde für fünf Minuten 1 ml der Testsubstanz dazugegeben. Danach wurde die Flüssigkeit wieder abgenommen, die Gläschen mit einem Gazedeckel verschlossen und auf ein mit 10 ml Wasser angefeuchtetes Tuch in eine Bellaplast-Schale (Rausch Verpackung GmbH, Augsburg) gestellt. Die Schalen wurden mit einem Deckel verschlossen und bei 23 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchte von 75 % im Dunkeln in einer Klimakammer für 42 Tage inkubiert. Es wurde in Versuchen mit *M. anisopliae* zweimal pro Woche mit Hilfe eines Stereomikroskops kontrolliert, ob Myzel aus den Eiern ausgewachsen war. Nach dem Schlupf wurden die Larven, wie unter dem Abschnitt 4.2.5 *Kalibrierkurven* beschrieben, behandelt und mit der ermittelten Anzahl von Larven (A_L) und Eiern (A_E) die Schlupfrate mit der oben beschriebenen Formel (siehe 4.2.6.1 *Vollgesogene Weibchen*) berechnet.

4.2.6.3 Ungesogene Larven

Zur Untersuchung der Effekte von Schädlingsbekämpfungsmitteln und *M. anisopliae* allein und in Kombination auf ungesogene Larven wurden diese (mindestens 30) mit einem Pinsel (helle Rindsohrhaare, Größe 1, LAT - Labor- und Analysen-Technik GmbH, Garbsen) für eine Minute in eine mit 1 ml der Testsubstanz gefüllte Petrischale getaucht. Danach wurden die Larven auf einem Filterpapier getrocknet und in Rollrandgläschen überführt. Diese wurden mit einem Gazedeckel verschlossen und auf ein mit 10 ml Wasser angefeuchtetes Tuch in eine Bellaplast-Schale (Rausch Verpackung GmbH, Augsburg) gestellt. Die Schalen wurden mit Deckeln verschlossen und bei 23 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchte von 75 % im Dunkeln inkubiert. Die Anzahl der toten Larven wurde mit Hilfe eines Stereomikroskops 14 Tage nach Behandlung mit den Schädlingsbekämpfungsmitteln bestimmt. Für die Versuche mit *M. anisopliae* wurde über einen Versuchszeitraum von 28 Tagen (*M. anisopliae* allein) bzw. 42 Tagen (für Kombinationen) zweimal wöchentlich die Mortalität kontrolliert (Kontrolle mit Stereomikroskop).

4.2.7 Statistik

Die Erstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven und die Berechnung der LC- (letale Konzentration) Werte wurden mit dem Programm PriProbit Version 1.63 (Sakuma 1996 - 2000) durchgeführt. Für die Weibchen wurde bei Behandlung mit Schädlingsbekämpfungsmitteln der EC- (effektive Konzentration) Wert ermittelt, da dabei nicht die Mortalität, sondern die Eiablageinhibition festgestellt wurde. Neben den EC₅₀/LC₅₀- und EC₉₅/LC₉₅-Werten wurde auch das 95 % Fiduzialintervall (Toleranzgrenze für die EC-/LC-Werte) berechnet. Zusätzlich zu der sigmoiden Kurve wurde die lineare Probitkurve mit einem 95 % Fiduzialintervall und zugehöriger Geradengleichung erstellt.

Weitere statistische Analysen wurden mit PASW 17 (Predictive Analysis SoftWare; SPSS Inc.) durchgeführt. Signifikante Unterschiede der Versuchsbehandlungen zur Kontrolle sowie Unterschiede zwischen Geschlechtern und zwischen den Pilzstämmen wurden mittels χ^2 -Tests bestimmt. Bei allen χ^2 -Tests betrug der Freiheitsgrad eins ($df = 1$). Aufgrund des Versuchsdesigns (jede Zecke wurde einzeln gehalten) war eine Korrektur der Mortalität und somit der direkte Vergleich der Mortalität in den Kombinationen mit der in den Einzel-Behandlungen von *M. anisopliae* oder von den Schädlingsbekämpfungsmitteln nicht möglich. Daher wurde nur auf signifikante Unterschiede zwischen den Varianten und den jeweiligen Kontrollen getestet. Zusätzlich wurde ein Chancenverhältnis (odds-ratio) für jede Variante und ihre Kontrolle berechnet, um so die Wahrscheinlichkeit bestimmen zu können, mit der ein

Todesereignis in der Variante oder in der Kontrolle auftreten würde. Ist das Chancenverhältnis dabei gleich eins ($CV = 1$), kann man von einer Homogenität der beiden Gruppen ausgehen. Bei einem Wert größer als eins ($CV > 1$) ist das Auftreten der Mortalität in den Varianten wahrscheinlicher als in der Kontrolle. Bei einem Wert kleiner eins ($CV < 1$) verhält es sich genau umgekehrt (Hatzinger und Nagel 2009, Polasek 2008). Sofern in den Kontrollgruppen keine Mortalität auftrat, wurde die Mortalität in den Kombinationen direkt auf statistisch signifikante Unterschiede zu den Mortalitäten in den Einzelbehandlungen von *M. anisopliae* und den Schädlingsbekämpfungsmitteln untersucht.

Die Mortalität der Weibchen wurde für einzelne Behandlungen über den Versuchszeitraum mit dem Log-Rang-Test analysiert. Eine Analyse der Unterschiede in den Mortalitätsverläufen, die durch die beiden *M. anisopliae*-Stämme verursacht wurden, erfolgte ebenfalls mit dem Log-Rang-Test. Unterschiede in der abgelegten Eimenge und der Schlupfrate wurden für die Varianten mittels U-Tests nach Mann und Whitney analysiert. Für die getesteten Eier wurden folgende Parameter mit dem U-Test nach Mann und Whitney auf Unterschiede zwischen den Varianten analysiert: Beginn des Myzelauswuchses aus behandelten Eiern, Beginn und Dauer des Larvenschlupfs sowie die Schlupfrate. Aufgrund des geringen Probenumfangs ($n = 4$), können die ermittelten statistischen Daten lediglich ein Indiz für vorliegende Unterschiede geben. Zur Ermittlung von Unterschieden in der Mortalität der Larven wurde die Gesamtmortalität (Mortalität am letzten Beobachtungstag) der einzelnen Varianten mittels des U-Tests nach Mann und Whitney analysiert. Das Signifikanzniveau wurde für alle Tests mit $p < 0,05$ angenommen. Hinweise auf signifikante Unterschiede in Abbildungen erfolgen mit Sternchen nach folgender Einteilung: $p > 0,05 = \text{n.s.}$ (nicht signifikant), $0,05 > p \geq 0,01 = *$, $0,01 > p \geq 0,001 = **$, $p < 0,001 = ***$. Für Kombinationen, die eine signifikant unterschiedliche Mortalität zur Tween- und DMSO-Kontrolle aufwiesen, wurde der jeweils vorliegende Effekt (additiv, synergistisch oder antagonistisch) über einen χ^2 -Test bestimmt (Morales-Rodriguez und Peck 2009, McVay *et al.* 1977). Zunächst wurde die erwartete Mortalität (M_E) der Kombinationen anhand der prozentualen Gesamtmortalität (der Mortalität des letzten Versuchstages), die durch *M. anisopliae* (M_{MA}) und das Schädlingsbekämpfungsmittel (M_{SBM}) allein verursacht wurde, mit folgender Formel berechnet:

$$M_E = M_{MA} + \left(M_{SBM} \times \left(1 - \frac{M_{MA}}{100} \right) \right)$$

Mit der erwarteten Mortalität und der beobachteten Mortalität der Kombinationen (M_{Kombi}) wurde ein $\chi^2_{(E)}$ -Wert berechnet:

$$\chi^2_{(E)} = \frac{(M_{\text{Kombi}} - M_E)^2}{M_E}$$

Dieser $\chi^2_{(E)}$ -Wert wurde mit dem χ^2 -Tabellenwert für einen Freiheitsgrad ($df = 1$) und dem 0,95 Quantil ($\chi^2 = 3,84$) verglichen. Ein nicht-additiver Effekt war zu beobachten, wenn der berechnete $\chi^2_{(E)}$ -Wert größer als der Tabellenwert war. Wenn die Differenz aus beobachteter und erwarteter Mortalität der Kombination positiv war, wurde die signifikante Interaktion als synergistisch, wenn sie negativ war als antagonistisch eingestuft (Finney 1947).

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Ermittlung der subletalen/subeffektiven Konzentrationen der Schädlingsbekämpfungsmittel

4.3.1.1 Vollgesogene Weibchen

4.3.1.1.1 Fipronil

In der DMSO-Kontrolle legten 5 % der Weibchen keine Eier ab. Die abgelegten Eipakete wogen $128,0 \pm 48,57$ mg. Die Schlupfrate der gelegten Eier lag in der Kontrolle bei $58,2 \pm 22,37$ %. Fipronil hatte in Konzentrationen von 0,064 und 0,32 ppm keine Wirkung auf die Anzahl der eierlegenden Weibchen ($\chi^2 = 0,69$, $p = 0,4$) (Abb. 37).

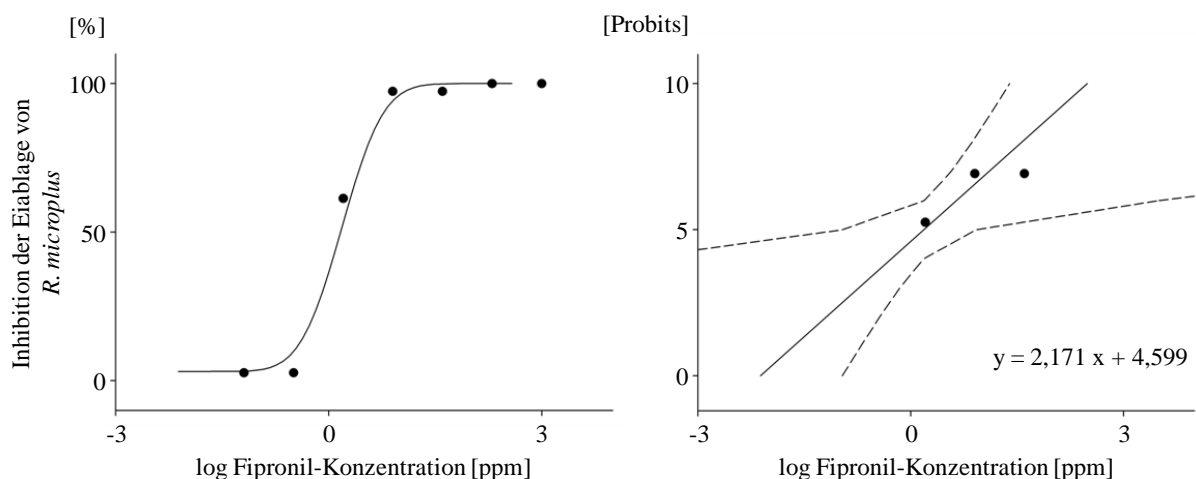


Abb. 37: Anteil der Weibchen von *R. microplus* ($n = 75$), die in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Fipronil-Konzentrationen 14 Tage nach der Behandlung keine Eier abgelegt hatten. Kurven stellen berechnete Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Prozent oder Probits mit 95 % Fiduzialintervall dar. Als Kontrollsubstanz diente 5 % DMSO. Die Kontrollmortalität lag bei 5 % und der EC_{50} -Wert bei einer Konzentration von 1,53 (0,11 – 8,36) ppm.

Die Eimenge und Schlupfrate unterschieden sich bei Behandlung mit 0,064 ppm nicht von der Kontrolle ($U \geq 2476$, $p \geq 0,6$). Bei Applikation von 0,32 ppm erhöhte sich die Menge der abgelegten Eier ($U = 2232$, $p = 0,029$). Bei Behandlung mit 1,6 ppm legten 61 % der Weibchen keine Eier ab ($\chi^2 = 52,9$, $p < 0,001$), damit reduzierte sich die Eimenge ($U = 405$, $p < 0,001$) und die Schlupfrate gegenüber der Kontrolle ($U = 284$, $p < 0,001$). Eine Konzentration von 8 ppm bewirkte eine Eiablageinhibition bei 97 % der Weibchen ($\chi^2 = 127$, $p < 0,001$). Es schlüpften bei Behandlung der Weibchen mit 40 ppm keine Larven aus den abgelegten Eiern ($U = 1,0$, $p = 0,056$). Die Eiablage konnte durch eine Behandlung mit 200 ppm komplett inhibiert werden ($U = 150$, $p < 0,001$) (Abb. 38). Aus diesen Werten berechnete sich 14 Tage nach Behandlung ein EC_{50} -Wert von 1,53 (0,11 – 8,36) ppm Fipronil und ein EC_{95} -Wert von 8,76 (2,86 – $4,35 \times 10^5$) ppm Fipronil (Abb. 37). Aufgrund des EC_{50} -Wertes, der Menge der abgelegten Eier und der Schlupfrate aus den Eiern wurden für die Kombinationsversuche 0,064 und 0,32 ppm Fipronil gewählt.

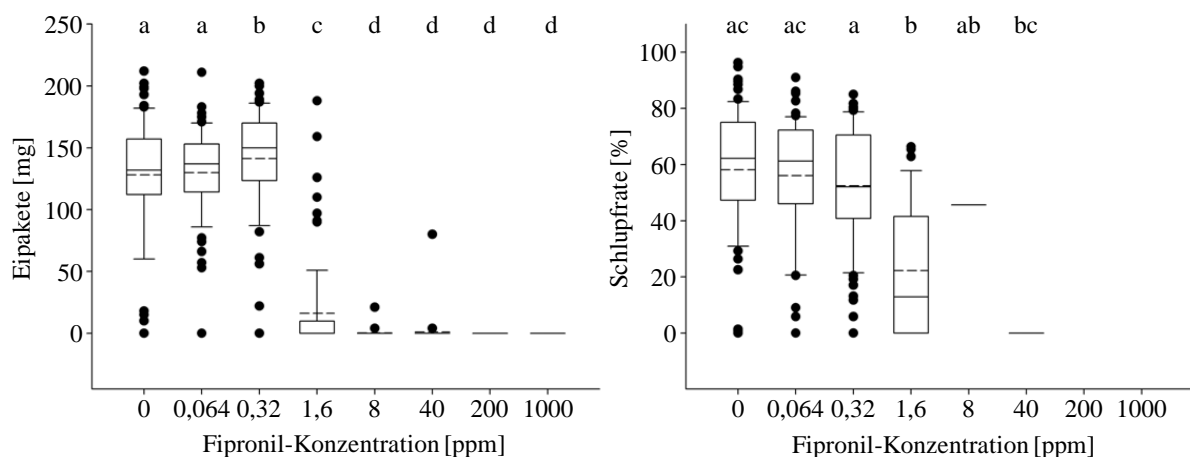


Abb. 38: Verteilung der Eigewichte und Schlupfraten von *R. microplus*. Behandelt wurden die Weibchen mit verschiedenen Fipronil-Konzentrationen. Als Kontrollsubstanz diente 5 % DMSO. Boxplots zeigen den Median (durchgezogene Linie), den Mittelwert (gestrichelte Linie), die 25/75 Perzentile und die 10/90 Perzentile an, Punkte die Ausreißer. Boxplots mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich (U-Test nach Mann und Whitney) ($n = 75$).

4.3.1.1.2. Amitraz

Weniger als 3 % der Weibchen in der DMSO-Kontrolle legten keine Eier ab. Die durchschnittliche Eimenge in der Kontrolle betrug $127,4 \pm 43,75$ mg und die Schlupfrate lag bei $56,9 \pm 24,57$ %. Die beiden niedrigsten Amitraz-Konzentrationen (0,064 und 0,32 ppm) hatten keinen Einfluss auf die behandelten Weibchen ($\chi^2 \leq 2,03$, $p \geq 0,15$) und damit keinen Einfluss auf die abgelegte Eimenge oder die Schlupfrate ($U \geq 2235$, $p \geq 0,09$). Nach Behandlung mit 1,6 ppm Amitraz erfolgte bei 24 % der Weibchen keine Eiablage mehr

($\chi^2 = 14,8$, $p < 0,001$) (Abb. 39). Es wurde sowohl die Eimenge ($U = 1126$, $p < 0,001$) als auch die Schlupfrate ($U \leq 1643,0$, $p \leq 0,04$) signifikant gegenüber der Kontrolle reduziert (Abb. 40).

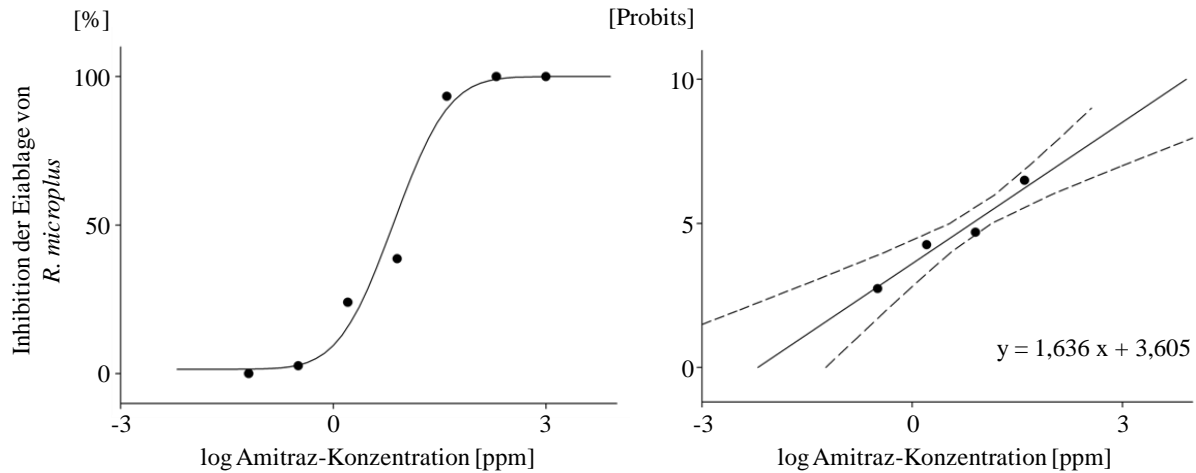


Abb. 39: Anteil der Weibchen von *R. microplus* ($n = 75$), die in Abhängigkeit von den unterschiedlichen Amitraz-Konzentrationen 14 Tage nach der Behandlung keine Eier abgelegt hatten. Kurven stellen berechnete Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Prozent oder Probits mit 95 % Fiduzialintervall dar. Als Kontrollsubstanz diente 5 % DMSO. Die Kontrollmortalität lag bei 3 % und der EC_{50} -Wert bei einer Konzentration von 7,13 (3,42 – 13,5) ppm.

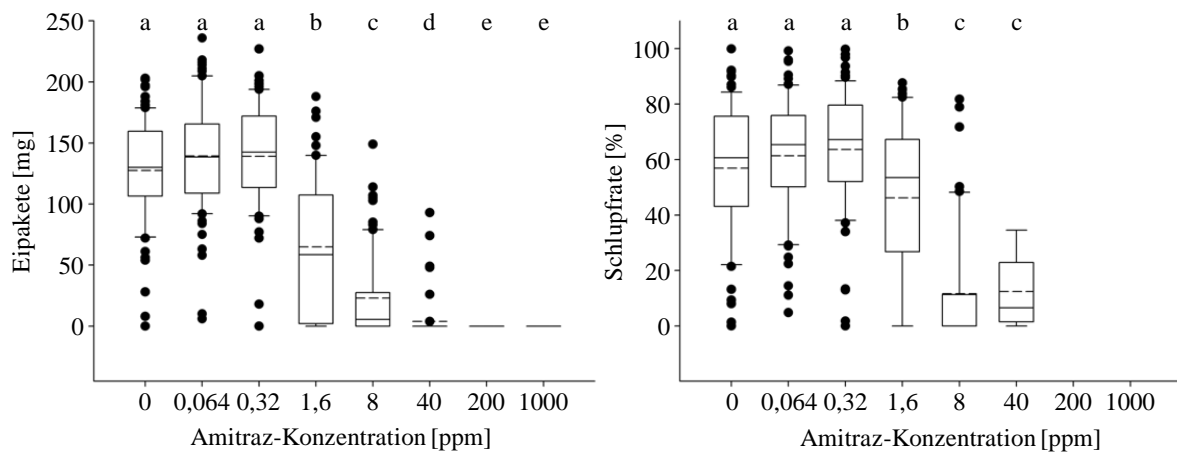


Abb. 40: Verteilung der Eigewichte und Schlupfraten von *R. microplus*. Behandelt wurden die Weibchen mit verschiedenen Amitraz-Konzentrationen. Als Kontrollsubstanz diente 5 % DMSO. Boxplots zeigen den Median (durchgezogene Linie), den Mittelwert (gestrichelte Linie), die 25./75. Perzentile und die 10./90. Perzentile an, Punkte die Ausreißer. Boxplots mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich (U-Test nach Mann und Whitney) ($n = 75$).

Nach Behandlung mit 40 ppm legten mehr als 93 % der Weibchen keine Eier mehr ab ($\chi^2 = 124$, $p < 0,001$). Bei Weibchen, die mit 200 ppm behandelt wurden, konnte die Eiablage komplett inhibiert werden ($U = 75,0$, $p < 0,001$). Es wurde 14 Tage nach Behandlung ein

EC₅₀- bzw. EC₉₅-Wert von 7,13 (3,42 – 13,5) ppm bzw. 72,2 (31,7 – 423) ppm ermittelt (Abb. 39). Aufgrund des EC₅₀-Wertes, der Menge der abgelegten Eier und der Schlupfrate aus den Eiern wurden für die Kombinationsversuche 0,32 und 1,6 ppm Amitraz gewählt.

4.3.1.2 Eier

Die Dosis-Wirkungs-Versuche wurden an den Eiern für alle Schädlingsbekämpfungsmittel parallel durchgeführt, so dass die Schlupfrate in der Kontrolle für alle fünf Schädlingsbekämpfungsmittel identisch war. Aus 28 % der Eier, die mit 1 % DMSO behandelt wurden, schlüpften keine Larven.

4.3.1.2.1 Fipronil

Fipronil hatte in den drei niedrigsten Konzentrationen (0,0128, 0,064 und 0,32 ppm) keine Wirkung auf die Schlupfrate ($U \geq 48,0$, $p \geq 0,18$). Die Schlupfrate der Larven aus Eiern, die mit 1,6 ppm oder mehr behandelt wurden, war geringer als die Schlupfrate in der DMSO-Kontrolle ($U = 13,5$, $p = 0,001$) (Abb. 41). Es schlüpften keine Larven aus Eiern, die mit 200 ppm behandelt wurden ($U = 0$, $p < 0,001$). Aus diesen Werten ergab sich ein LC₅₀-Wert von 0,36 (0,06 – 1,12) ppm Fipronil (Abb. 41) und ein LC₉₅-Wert von 81,4 (19,7 – 1288) ppm (Tab. 14). Für die Kombinationsversuche wurden 0,32 und 1,6 ppm Fipronil gewählt.

4.3.1.2.2 Amitraz

Behandlungen der Eier mit bis zu 1,6 ppm Amitraz hatten auf die Schlupfrate der Larven keinen Effekt ($U \geq 51,5$, $p \geq 0,24$). Nach Behandlung mit 1,6 ppm schlüpften nur noch aus 33 % der Eier Larven ($U = 39$, $p = 0,06$). Die Schlupfrate konnte durch Behandlung der Eier mit 8 ppm oder mehr signifikant reduziert werden (auf unter 22 %) ($U = 27,5$, $p = 0,008$). Es schlüpften keine Larven aus Eiern, die mit 200 ppm behandelt wurden ($U = 6$, $p < 0,001$). Aus diesen Werten berechnete sich ein LC₅₀- bzw. LC₉₅-Wert von 0,66 (0,007 – 3,26) ppm bzw. von 263 (36,1 – 3,67 x 10⁵) ppm Amitraz (Abb. 41, Tab. 14). Für die Kombinationsversuche wurden 0,0128 und 0,064 ppm Amitraz gewählt.

4.3.1.2.3 Permethrin

Erst die beiden höchsten Permethrin-Konzentrationen bewirkten einen Unterschied der Schlupfrate im Vergleich zur Kontrolle ($U \leq 37,5$, $p \leq 0,045$). Larven schlüpften aus 29 % der Eier, die mit 200 ppm behandelt wurden und aus 15 % der Eier, die mit 1000 ppm behandelt wurden (Abb. 41). Für Permethrin errechnete sich ein LC₅₀-Wert von 83,3 (16,9 – 255) ppm. Da mit der höchsten getesteten Konzentration die Schlupfrate auf maximal 85 % reduziert

wurde, konnte nur eine Abschätzung des LC₉₅-Wert vorgenommen werden (>30000 ppm [4112 – 1,59 x 10⁷ ppm]) (Tab. 14). Für die Kombinationsversuche wurde 40 ppm Permethrin gewählt.

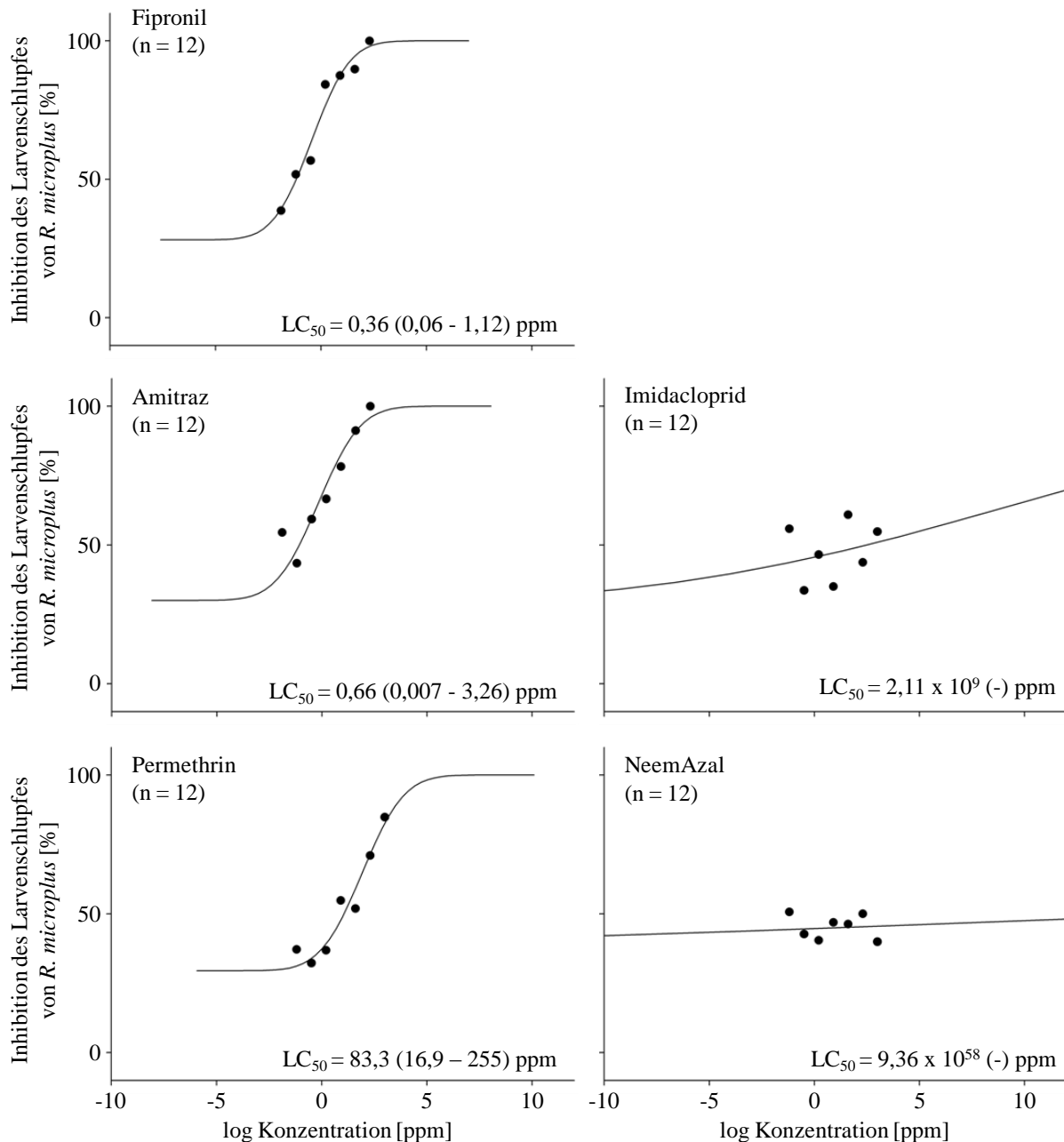


Abb. 41: Anteil der Eier von *R. microplus* (n = 12), aus denen bis 42 Tage nach der Behandlung mit unterschiedlichen Fipronil-, Amitraz-, Permethrin-, Imidacloprid- oder NeemAzal-Konzentrationen keine Larven geschlüpft waren. Kurven stellen berechnete Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Prozent dar. Als Kontrollsubstanz diente 1 % DMSO. Die Kontrollmortalität lag bei 28 %. Für Probitgleichung und LC₉₅-Werte mit Fiduzialintervall siehe Tab. 14.

Tab. 14: Gleichungen der Probit-Log Relation der Dosis-Wirkungs-Kurven sowie die berechneten LC₉₅-Werte mit Fiduzialintervallen (FI₉₅) der verschiedenen Schädlingsbekämpfungsmittel für die Eier von *R. microplus*.

Schädlingsbekämpfungsmittel	n	Gleichung der Probit-log Relation	LC ₉₅ -Wert [ppm]	FI ₉₅ [ppm]
Fipronil	12	$y = 0,698 x + 5,310$	81,4	19,7 – 1288
Amitraz	12	$y = 0,632 x + 5,115$	263	36,1 – $3,67 \times 10^5$
Permethrin	12	$y = 0,637 x + 3,777$	31974	4112 – $1,6 \times 10^7$
Imidacloprid	12	$y = 0,075 x + 4,299$	$1,62 \times 10^{31}$	-
NeemAzal	12	$y = 0,013 x + 4,242$	$8,12 \times 10^{186}$	-

4.3.1.2.4 Imidacloprid

Keine der getesteten Konzentrationen von Imidacloprid bewirkte eine signifikante Veränderung der Schlupfrate im Vergleich zur Kontrolle ($U \geq 56$, $p \geq 0,38$). Die geringste Schlupfrate von 45 % trat in der Behandlung mit der höchsten Imidacloprid-Konzentration von 1000 ppm auf (Abb. 41). Aufgrund der geringen Wirkung von Imidacloprid in den getesteten Konzentrationen konnte nur eine ungefähre Abschätzung des LC₅₀-Wertes erfolgen. Es konnten aber keine Fiduzialintervalle ermittelt werden. Der LC₅₀-Wert wurde mit $2,11 \times 10^9$ ppm und der LC₉₅-Wert mit $>1,0 \times 10^{31}$ ppm ermittelt (Tab. 14). Aufgrund des hohen LC₅₀-Wertes und der folglich geringen Wirksamkeit wurden für die Eier keine Kombinationsversuche mit Imidacloprid durchgeführt.

4.3.1.2.5 NeemAzal

Die Schlupfinhibition durch NeemAzal lag maximal bei 50 % (200 ppm). Es konnte aber mit keiner der getesteten Konzentrationen eine signifikant geringere Schlupfrate als in der Kontrolle erzielt werden ($U \geq 57,5$, $p \geq 0,41$) (Abb. 41). Da mit der höchsten getesteten Konzentration max. 50 % der Larven am Schlüpfen aus den Eiern gehindert werden konnten, ließ sich aus den Werten kein realistischer LC₅₀-Wert bestimmen und es konnten auch keine Fiduzialintervalle ermittelt werden. Der LC₅₀-Wert wurde mit $9,36 \times 10^{58}$ ppm berechnet. Der LC₉₅-Wert lag deutlich höher ($8,12 \times 10^{186}$ ppm) (Tab. 14). Aufgrund des extrem hohen errechneten LC₅₀-Wertes wurden für die Eier keine Kombinationsversuche mit NeemAzal durchgeführt.

4.3.1.3 Ungesogene Larven

4.3.1.3.1 Fipronil

In der Kontrolle starben innerhalb von 14 Tagen 12 % der getesteten Larven. Die Mortalität in der Kontrolle und in den Fipronil-Behandlungen bis 8 ppm unterschied sich nicht ($U \geq 27,0$, $p \geq 0,089$). Nach Behandlung mit 8 ppm oder mehr starben mehr Larven (77 %) als in der Kontrolle ($U \leq 7,5$, $p < 0,001$). Alle Larven starben, wenn sie mit 1000 ppm behandelt wurden ($U = 0$, $p < 0,001$). Aus diesen Werten errechnete sich ein LC_{50} -Wert von 0,26 (0,03 – 0,84) ppm Fipronil (Abb. 42) und ein LC_{95} -Wert von 68,5 (17,4 – 1075) ppm (Tab. 15). Für die Kombinationsversuche wurden 0,0128 und 0,064 ppm Fipronil gewählt.

Tab. 15: Gleichungen der Probit-log Relation der Dosis-Wirkungs-Kurven sowie die berechneten LC_{95} -Werte mit Fiduzialintervallen (FI_{95}) der verschiedenen Schädlingsbekämpfungsmittel für die Larven von *R. microplus*.

Schädlingsbekämpfungsmittel	n	Gleichung der Probit-log Relation	LC_{95} -Wert [ppm]	FI_{95} [ppm]
Fipronil	10	$y = 0,679 x + 5,399$	68,5	17,44 – 1075
Amitraz	10	$y = 0,276 x + 5,211$	$1,60 \times 10^5$	$821 - 1,60 \times 10^{43}$
Permethrin	6	$y = 1,011 x + 2,722$	7578	2597 – 63975
Imidacloprid	6	$y = 2,563 x - 2,254$	2965	1644 – 36100
NeemAzal	6	$y = 2,679 x - 4,137$	10599	$5365 - 3,65 \times 10^5$

4.3.1.3.2 Amitraz

Die Kontrollmortalität betrug 12 %. Die Mortalität in den Behandlungen mit bis zu 8 ppm Amitraz war nicht unterschiedlich zu der in der Kontrolle ($U \geq 35,0$, $p \geq 0,28$). Behandlungen mit Amitraz-Konzentrationen von 40, 200 oder 1000 ppm verursachten eine signifikant höhere Mortalität (70 bis 100 %) als die DMSO-Kontrolle ($U \leq 11,0$, $p \leq 0,003$). Es wurde ein LC_{50} -Wert von 0,17 ($8,78 \times 10^{-16} - 3,73$) ppm Amitraz und ein LC_{95} -Wert von $1,60 \times 10^5$ ($821 - 1,60 \times 10^{43}$) ppm ermittelt (Abb. 42, Tab. 15). Für die Kombinationsversuche wurden 0,0128 und 0,064 ppm Amitraz gewählt.

4.3.1.3.3 Permethrin

In der Kontrolle starben etwas weniger als 12 % der Larven. Keine der Konzentrationen (bis auf 5000 ppm) verursachte eine gegenüber der Kontrolle gesteigerte Mortalität ($U \geq 28,0$, $p \geq 0,105$). Es starben aber alle Larven, die mit 5000 ppm behandelt wurden ($U = 0,0$, $p < 0,001$). Der LC_{50} -Wert bzw. LC_{95} -Wert für Permethrin wurde mit 179 (74,3 – 362) ppm

bzw. 7578 (2597 – 63975) ppm errechnet (Abb. 42, Tab. 15). Für die Kombinationsversuche wurden 8 und 40 ppm Permethrin ausgewählt.

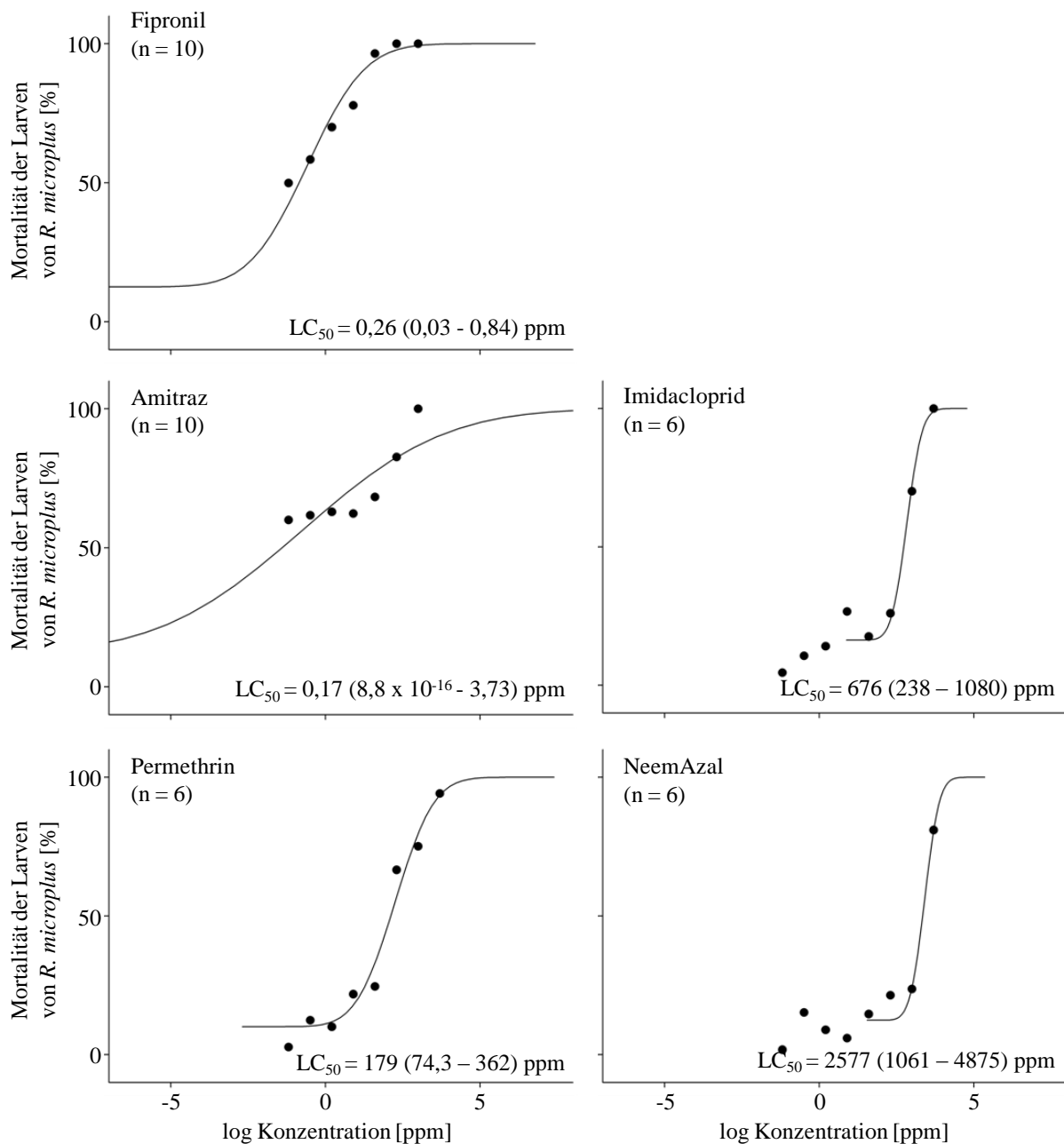


Abb. 42: Anteil der toten, ungesogenen Larven von *R. microplus* in Abhängigkeit der unterschiedlichen Fipronil-, Amitraz-, Permethrin-, Imidacloprid- oder NeemAzal-Konzentrationen 14 Tage nach Behandlung. Kurven stellen berechnete Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Prozent dar. Als Kontrollsubstanz diente 1 % DMSO. Die Kontrollmortalität lag bei 12 – 15 %. Für Probitgleichung und LC₉₅-Werte mit Fiduzialintervall siehe Tab. 15.

4.3.1.3.4 Imidacloprid

Die Kontrollmortalität betrug 15 %. Behandlungen mit bis zu 200 ppm Imidacloprid erhöhten die Mortalität nicht signifikant im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ($U \geq 12,0$, $p \geq 0,394$). Konzentrationen von 1000 bzw. 5000 ppm verursachten Mortalitäten von 70 bzw. 100 %. Diese waren tendenziell höher als die in der Kontrolle ($U = 7,0$, $p = 0,093$ [1000 ppm], $U = 0,0$, $p = 0,071$ [5000 ppm]). Der LC_{50} - bzw. LC_{95} -Wert wurde mit 676 (238 – 1080) ppm bzw. 2965 (1644 – 36100) ppm ermittelt (Abb. 42, Tab. 15). Für die Kombinationsversuche wurden 40 und 200 ppm Imidacloprid gewählt.

4.3.1.3.5 NeemAzal

Es starben in der Kontrolle 13 % der getesteten Larven. Einen Unterschied zwischen der Mortalität in der Kontrolle und in den NeemAzal-Behandlungen gab es nur bei der höchsten Konzentration von 5000 ppm (81 % Mortalität) ($U = 1,0$, $p = 0,002$). Aus diesen Werten berechnete sich ein LC_{50} -Wert von 2577 (1061 – 4875) ppm und ein LC_{95} -Wert von 10599 (5365 – $3,6 \times 10^5$) ppm NeemAzal (Abb. 42, Tab. 15). Da NeemAzal nur bis 200 ppm auf Kompatibilität gegenüber MA-K und MA-7 getestet wurde, aufgrund des hohen LC_{50} -Wertes aber deutlich höhere Konzentrationen von NeemAzal für die Kombinationsversuche benötigt worden wären, wurden keine Kombinationsversuche mit NeemAzal durchgeführt.

4.3.2 Ermittlung der konzentrationsabhängigen Wirkungsgrade von MA-K und MA-7

4.3.2.1 Vollgesogene Weibchen

Die Kontrollmortalität in den Dosis-Wirkungs-Versuchen mit *M. anisopliae* lag bei circa 2 %. Es wuchs aus 78 % der mit MA-K oder MA-7 behandelten Weibchen Pilzmyzel aus. Die Mortalität in den Behandlungen von $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-K oder MA-7 sowie von $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml MA-7 unterschied sich nicht von der Kontrolle ($\chi^2 \leq 1,9$, $p \geq 0,17$). Es starben aber mehr Weibchen nach Behandlung mit $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml MA-K als in der Kontrolle ($\chi^2 = 6,2$, $p = 0,013$). Bei Behandlung mit $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml MA-K bzw. MA-7 starben 20 % bzw. 35 % der Weibchen ($\chi^2 \geq 10,4$, $p \leq 0,001$). Alle Weibchen starben nach Behandlung mit $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml ($\chi^2 = 116$, $p < 0,001$). Die Mortalitäten von MA-K und MA-7 unterschieden sich in den jeweiligen Konzentrationen nicht voneinander ($\chi^2 \leq 2,1$, $p \geq 0,14$). Bei der Berechnung der LC_{50} -Werte ergab sich (14 Tage nach Behandlung) für MA-K eine Konzentration von $2,56 \times 10^6$ Konidien/ml und für MA-7 eine Konzentration von $1,10 \times 10^6$ ($1,53 \times 10^5$ – $5,64 \times 10^6$) Konidien/ml (Abb. 43). Auch die LC_{95} -Werte waren mit

$1,47 \times 10^8$ bzw. $1,92 \times 10^8$ ($2,39 \times 10^7 - 9,17 \times 10^{10}$) Konidien/ml für MA-K bzw. MA-7 ähnlich.

Die Eipakete, die von Weibchen in der Kontrollgruppe abgelegt wurden, wogen $132,1 \pm 42,54$ mg (Abb. 44). Eine Abnahme der gelegten Eipakete im Vergleich zur Kontrolle konnte ab $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-K (mit der Ausnahme bei $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml) und ab $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml von MA-7 erreicht werden ($U \leq 1390$, $p \leq 0,043$). Unterschiede in den Eigewichten durch die eingesetzten Konzentrationen von MA-K und MA-7 ergaben sich nur bei $1,0 \times 10^4$ und $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml ($U \leq 1290$, $p \leq 0,015$). In den Behandlungen mit den höheren Konzentrationen der beiden Pilzstämmen war die Menge der Eier aber nicht unterschiedlich ($U \geq 1646$, $p \geq 0,42$).

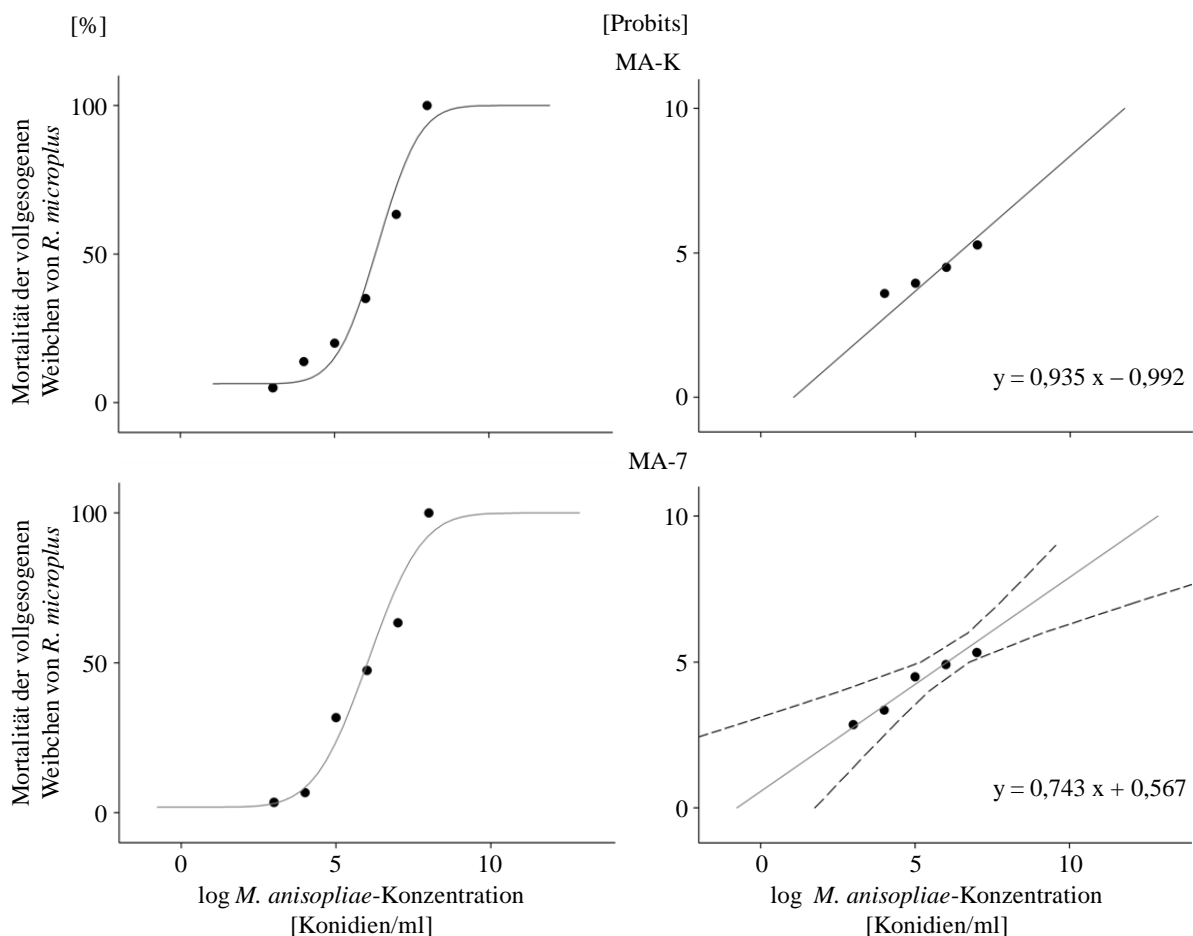


Abb. 43: Anteil der toten, vollgesogenen Weibchen von *R. microplus* ($n = 60$) in Abhängigkeit von den unterschiedlichen MA-K- und MA-7-Konzentrationen. Kurven stellen berechnete Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Prozent oder Probits mit 95 % Fiduzialintervall dar. Als Kontrollsubstanz diente 0,05 % Tween80. Die Kontrollmortalität lag bei 2 %. Der LC_{50} -Wert lag für MA-7 bei einer Konzentration von $1,10 \times 10^6$ ($1,53 \times 10^5 - 5,64 \times 10^6$) Konidien/ml und für MA-K bei $2,56 \times 10^6$ Konidien/ml.

Werden die Eipakete von Weibchen, die innerhalb des Versuchszeitraums gestorben waren, nicht berücksichtigt, waren die abgelegten Eimengen in den Behandlungen mit MA-K, MA-7 oder 0,05 % Tween 80 ähnlich ($U \geq 1125$, $p \geq 0,068$).

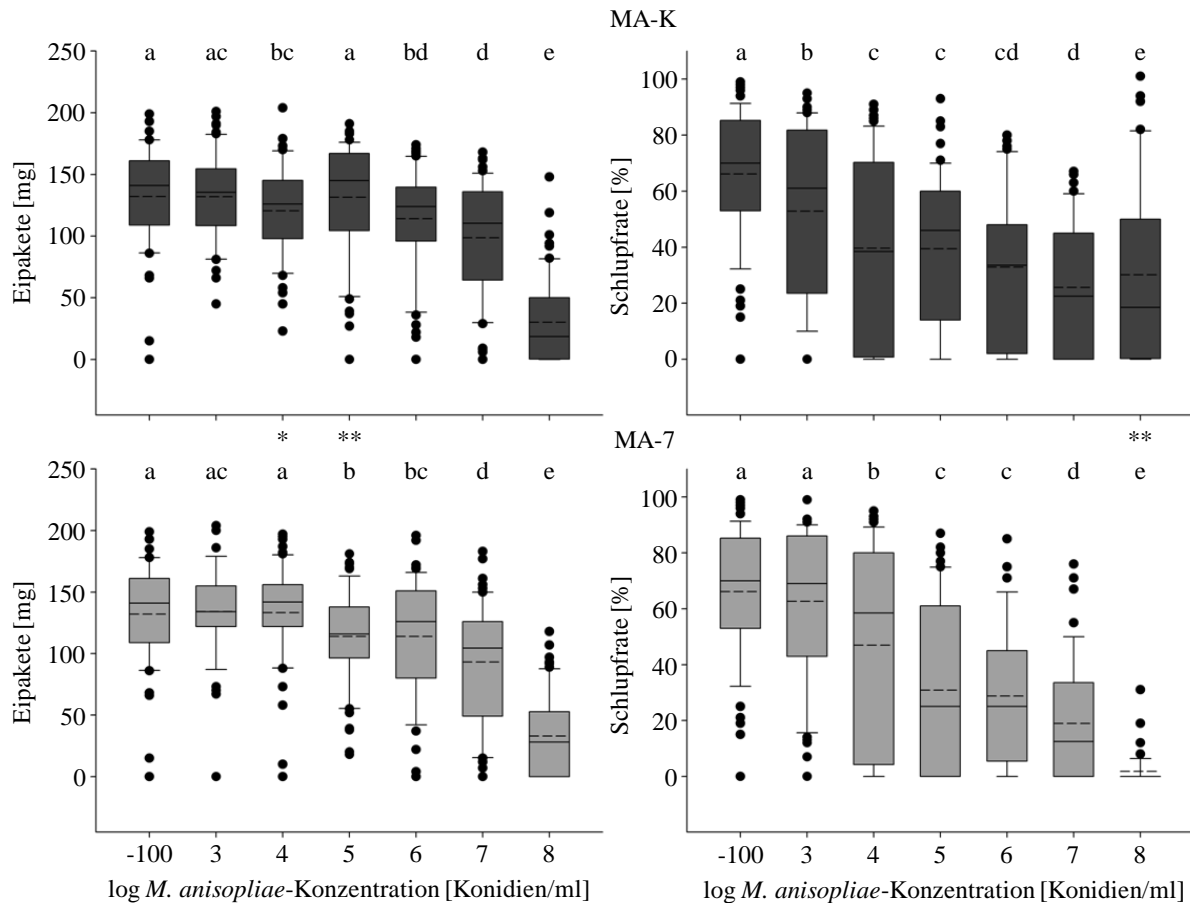


Abb. 44: Verteilung der Eigewichte und Schlupfraten von *R. microplus*. Behandelt wurden die Weibchen mit verschiedenen MA-K- und MA-7-Konzentrationen. Als Kontrollsubstanz diente 0,05 % Tween80. Boxplots zeigen den Median (durchgezogene Linie), den Mittelwert (gestrichelte Linie), die 25/75 Perzentile und die 10/90 Perzentile an, Punkte die Ausreißer. Boxplots mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich (U-Test nach Mann und Whitney). Sternchen zeigen Unterschiede zwischen MA-K und MA-7 an (U-Test nach Mann und Whitney) (n = 60).

Die Schlupfrate der Larven aus den Eiern lag in der Kontrolle bei $66,1 \pm 23,69$ % (Abb. 44). Wurden die Weibchen mit mindestens $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml von MA-K oder $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-7 behandelt, war die Schlupfrate der Larven aus diesen Eiern gegenüber der Kontrolle signifikant niedriger ($U \leq 1354$, $p \leq 0,038$). Nur in der höchsten Konzentration gab es zwischen MA-K und MA-7 einen Unterschied in der Schlupfrate ($U = 718$, $p = 0,009$). Es machte für die Schlupfrate keinen Unterschied, ob die Eier von Weibchen, die im Versuchszeitraum gestorben waren, in die Auswertung mit einbezogen wurden oder nicht. Die Schlupfrate in den Behandlungen ab $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml MA-K oder MA-7 war im

Vergleich zu der Schlupfrate in der Tween-Kontrolle signifikant niedriger, wenn nur Eier von am Leben gebliebenen Weibchen betrachtet wurden ($U \leq 1157$, $p \leq 0,008$). Aufgrund des EC_{50} -Wertes, der Menge der abgelegten Eier und der Schlupfrate aus den Eiern wurden für die Kombinationsversuche $1,0 \times 10^6$ und $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml ausgewählt.

4.3.2.2 Eier

In der Kontrolle schlüpften 19 % der Larven nicht (Abb. 45). Ein Myzelauswuchs begann 18 Tage nach Behandlung und war in allen Versuchen ab $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml zu beobachten. Der Anteil der verpilzten Eier nahm konzentrationsabhängig zu. Die Behandlung der Eier mit Konzentrationen zwischen $1,0 \times 10^1$ und $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml von MA-K hatte keinen

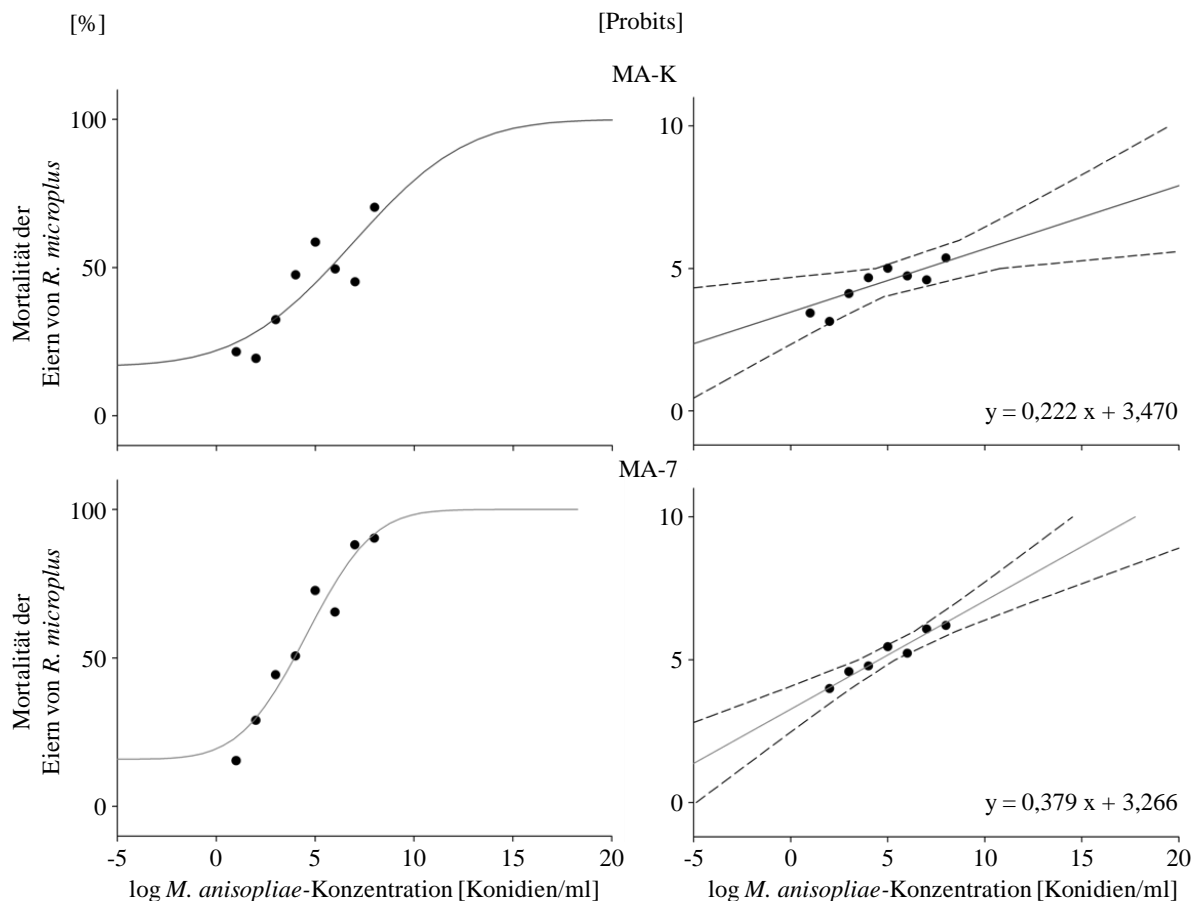


Abb. 45: Anteil der Eier von *R. microplus* ($n = 12$), aus denen bis 42 Tage nach der Behandlung mit unterschiedlichen MA-K- und MA-7-Konzentrationen keine Larven geschlüpft waren. Kurven stellen berechnete Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Prozent oder Probits mit 95 % Fiduzialintervall dar. Als Kontrollsubstanz diente 0,05 % Tween80. Die Kontrollmortalität lag bei 19 %. Der LC_{50} -Wert lag für MA-7 bei einer Konzentration von $3,72 \times 10^4$ ($3,10 \times 10^3 - 2,36 \times 10^5$) Konidien/ml und für MA-K bei $7,87 \times 10^6$ ($2,36 \times 10^4 - 5,85 \times 10^{10}$) Konidien/ml.

Effekt auf den Anteil der geschlüpften Larven ($U \geq 43,0$, $p \geq 0,10$). Ab $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml von MA-K nahm der Anteil der geschlüpften Larven konzentrationsabhängig auf bis zu 30 % ($1,0 \times 10^8$ Konidien/ml) ab ($U \leq 34,5$, $p \leq 0,028$).

In den niedrigsten Konzentrationen von MA-7 gab es keine Unterschiede zur Kontrolle ($U \geq 55$, $p \geq 0,35$). Ab $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml von MA-7 war der Anteil der geschlüpften Larven signifikant geringer im Vergleich zur Kontrolle und nahm konzentrationsabhängig auf bis zu 10 % ab ($U \leq 33,5$, $p \leq 0,024$) (Abb. 45). Die Unterschiede zwischen den beiden *M. anisopliae*-Stämmen in den Konzentrationen bis $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml waren nicht signifikant ($U \geq 45,5$, $p \geq 0,12$). Die Schlupfrate war nach Behandlung mit $1,0 \times 10^7$ und $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml MA-7 aber geringer als mit MA-K ($U \leq 21,0$, $p \leq 0,002$). Der LC_{50} -Wert für MA-K bzw. MA-7 wurde 42 Tage nach Behandlung mit $7,87 \times 10^6$ ($2,36 \times 10^4 - 5,85 \times 10^{10}$) Konidien/ml bzw. $3,72 \times 10^4$ ($3,10 \times 10^3 - 2,36 \times 10^5$) Konidien/ml errechnet. Für den LC_{95} -Wert ergaben sich Konzentrationen von $2,04 \times 10^{14}$ ($3,67 \times 10^{10} - 1,27 \times 10^{37}$) Konidien/ml von MA-K oder $8,09 \times 10^8$ ($6,20 \times 10^7 - 9,03 \times 10^{10}$) Konidien/ml von MA-7 (Abb. 45). Für die Kombinationsversuche wurde für MA-K $1,0 \times 10^5$ und $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml und für MA-7 $1,0 \times 10^2$ und $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml gewählt.

4.3.2.3 Ungesogene Larven

Es starben 3,3 % der Larven innerhalb von 28 Tagen, wenn sie mit 0,05 % Tween80 behandelt wurden. Es konnte an 72 % der toten Larven ein Myzelauswuchs beobachtet werden. Nur die geringste Konzentration von $1,0 \times 10^1$ Konidien/ml von MA-K und MA-7 verursachte eine ähnlich geringe Mortalität wie die Tween-Behandlung ($U = 25,0$, $p = 0,06$ [MA-K], $U = 36,0$, $p = 0,32$ [MA-7]). Die Mortalität nahm mit steigender Konidienkonzentration zu und erreichte bei $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml einen Wert von 86 % (MA-K) bzw. 94 % (MA-7) ($U \leq 23,5$, $p \leq 0,043$). Für den errechneten LC_{50} -Wert nach 28 Tagen für MA-K bzw. MA-7 ergab sich eine Konzentration von $8,32 \times 10^6$ ($9,99 \times 10^4 - 2,94 \times 10^7$) Konidien/ml bzw. $5,39 \times 10^4$ ($5,41 \times 10^3 - 2,79 \times 10^5$) Konidien/ml (Abb. 46). Der LC_{95} -Wert wurde für MA-K mit $7,13 \times 10^8$ ($1,14 \times 10^8 - 1,10 \times 10^{15}$) Konidien/ml und für MA-7 mit $1,53 \times 10^9$ ($1,39 \times 10^8 - 1,19 \times 10^{11}$) Konidien/ml ermittelt. Da die Unterschiede zwischen MA-K und MA-7 in den einzelnen Konzentrationen jedoch nicht signifikant waren ($U \geq 28,0$, $p \geq 0,11$), wurde sowohl für MA-K als auch für MA-7 für die Kombinationsversuche $1,0 \times 10^5$ und $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml gewählt.

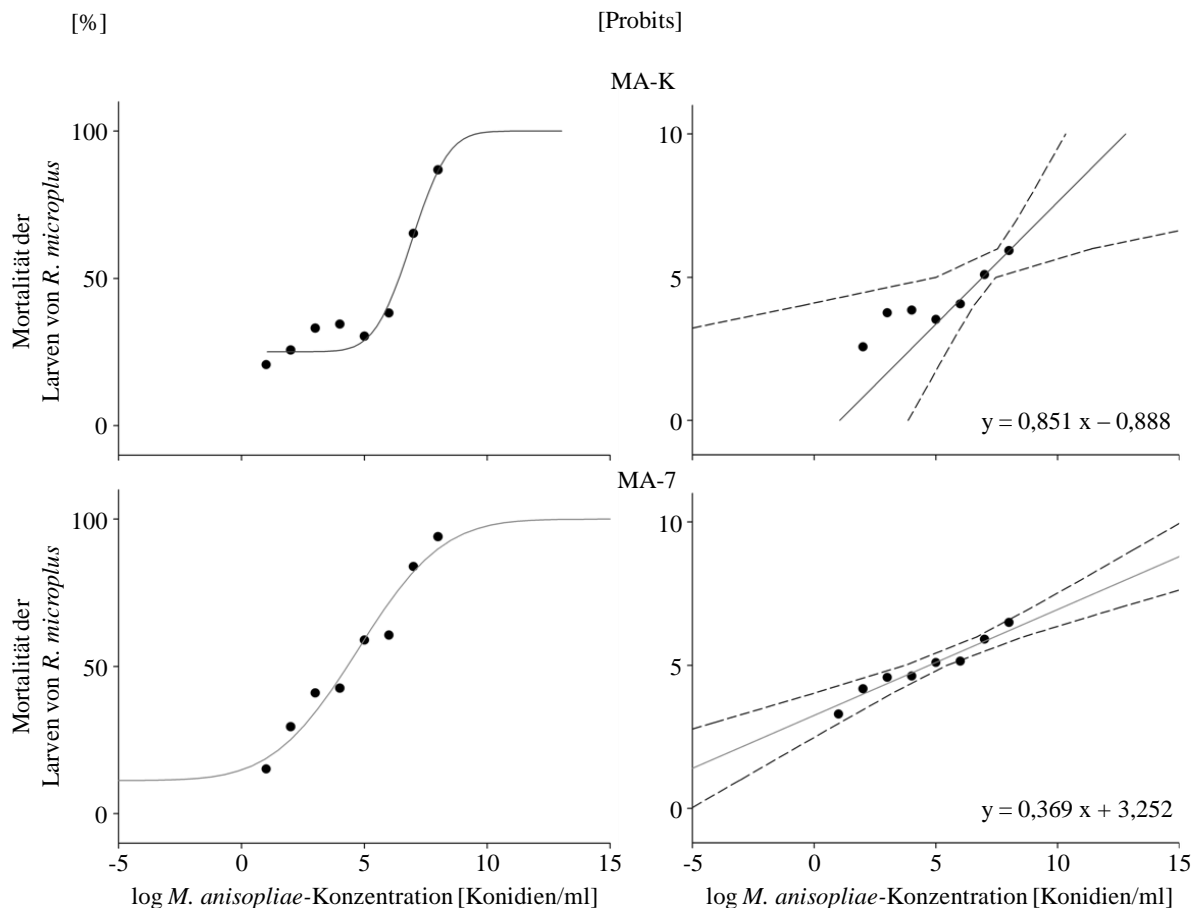


Abb. 46: Anteil der toten, ungesogenen Larven von *R. microplus* ($n = 10$) in Abhängigkeit der unterschiedlichen MA-K- und MA-7-Konzentrationen 28 Tage nach der Behandlung. Kurven stellen berechnete Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Prozent oder Probits mit 95 % Fiduzialintervall dar. Als Kontrollsubstanz diente 0,05 % Tween80. Die Kontrollmortalität lag bei 3,3 %. Der LC_{50} -Wert lag für MA-7 bei einer Konzentration von $5,39 \times 10^4$ ($5,41 \times 10^3 - 2,79 \times 10^5$) Konidien/ml und für MA-K bei $8,32 \times 10^6$ ($9,99 \times 10^4 - 2,94 \times 10^7$) Konidien/ml.

4.3.3 Versuche mit den Kombinationen aus *M. anisopliae* und Schädlingsbekämpfungsmitteln

4.3.3.1 Vollgesogene Weibchen

4.3.3.1.1 *M. anisopliae* und Fipronil

4.3.3.1.1.1 Mortalität

Es starben innerhalb von 14 Tagen 2 % der Weibchen in der Tween- und 7 % in der DMSO-Kontrolle. Bei Behandlung mit 0,064 ppm bzw. 0,32 ppm Fipronil starben 5 % bzw. 9 % der Weibchen. Die Mortalitäten in den Fipronil-Behandlungen unterschieden sich nicht signifikant von der Mortalität in der DMSO-Kontrolle ($\chi^2 \leq 0,2$, $p \geq 0,69$).

MA-K und Fipronil

Alle Behandlungen mit MA-K allein (oder in Kombination mit Fipronil) verursachten eine

signifikant höhere Mortalität als die Tween- (bzw. DMSO-) Kontrolle ($\chi^2 \geq 13,8$, $p < 0,001$) (Abb. 47). Die Chancenverhältnisse der MA-K-Fipronil-Kombinationen zu DMSO waren deutlich höher (mindestens neunmal) als die jeweiligen Fipronil-Varianten allein (Tab. 16). Die Chancenverhältnisse der Kombination von $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml und 0,064 ppm sowie der Kombination von $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml und 0,32 ppm zu Tween waren deutlich geringer als das Chancenverhältnis von MA-K allein, und damit war die Wahrscheinlichkeit, dass durch die Kombinationen eine Mortalität verursacht wird, geringer als für MA-K allein. Die Kombination von $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml mit der höheren Fipronil-Konzentration wies aber ein höheres Chancenverhältnis auf, ebenso wie die Kombinationen mit $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml. Die Interaktion von $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K und 0,064 ppm war antagonistisch. Die Interaktionen in den anderen Kombinationen waren additiv.

MA-7 und Fipronil

In allen Behandlungen mit MA-7 (allein und in Kombination mit Fipronil) war die Mortalität signifikant höher als in der Kontrolle ($\chi^2 \geq 13,8$, $p < 0,001$). Auch war die Mortalität in den Kombinationen höher als die in der DMSO-Kontrolle ($\chi^2 \geq 9,8$, $p \leq 0,002$) (Abb. 48). Die Chancenverhältnisse der Kombinationen waren höher als die der Fipronil-Varianten. Die Chancenverhältnisse beider Kombinationen von Fipronil mit $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml waren höher als das von MA-7 allein. Die Kombinationen mit $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml und die Kombination mit $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml wiesen deutlich geringere Chancenverhältnisse auf als MA-7 allein. Der Interaktion von $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml und 0,32 ppm war antagonistisch. Die Effekte aller anderen Kombinationen waren additiv (Tab. 17).

Der Vergleich der beiden Stämme ergab, dass $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-7 allein oder in Kombination mit 0,32 ppm Fipronil eine (tendenziell) geringere Mortalität verursachte als MA-K oder die dazugehörigen Kombinationen ($\chi^2 \geq 3,7$, $p \leq 0,055$) (Abb. 47 und Abb. 48). Alle anderen Varianten wiesen eine gleichartige Mortalität auf ($\chi^2 \leq 2,6$, $p \geq 0,11$).

4.3.3.1.1.2 Eiablage

Weibchen, die mit 0,05 % Tween80 bzw. 1 % DMSO behandelt wurden, legten $125,8 \pm 41,34$ mg bzw. $129,1 \pm 43,11$ mg Eier (Abb. 49). Die Eimengen in den Ansätzen von 0,05 % Tween80, 1 % DMSO, 0,064 ppm Fipronil und 0,32 ppm Fipronil waren ähnlich ($U \geq 1555$, $p \geq 0,58$).

MA-K und Fipronil

Die niedrigste Konidien-Konzentration von MA-K ($1,0 \times 10^6$ Konidien/ml) hatte weder allein noch in Kombination mit Fipronil einen Einfluss auf die abgelegte Eimenge im Vergleich mit der Tween- oder der DMSO-Kontrolle oder Fipronil allein ($U \geq 1482$, $p \geq 0,27$). Es gab auch keine Unterschiede zwischen den Eimengen in den Kombinationen und der Behandlung mit MA-K ($U \geq 1618$, $p \geq 0,61$). Die Eiablage konnte in allen Behandlungen mit $1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml allein oder in Kombination mit Fipronil im Vergleich zur Eimenge in den Behandlungen mit Tween, DMSO und Fipronil reduziert werden ($U \leq 1158$, $p \leq 0,01$). Zwischen der Eimenge in den Kombinationen und in der Behandlung mit MA-K gab es keine Unterschiede ($U \geq 1316$, $p \geq 0,14$).

MA-7 und Fipronil

Die Kombination von $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-7 mit 0,064 ppm verringerte (in der Tendenz) die Anzahl der abgelegten Eier im Vergleich zur Behandlung mit Tween, DMSO oder Fipronil allein ($U = 1330$, $p = 0,071$ [Tween], $U = 1302$, $p = 0,05$ [DMSO], $U = 1294$, $p = 0,061$ [0,064 ppm]). Die Eimenge in dieser Kombination war auch geringer als die in der Behandlung mit MA-7 ($U = 1198$, $p = 0,032$). Die Eimenge in der Behandlung mit $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-7 allein und der anderen Kombination ($1,0 \times 10^6$ Konidien/ml mit 0,32 ppm) unterschied sich aber nicht von denen in der Kontroll- und Fipronil-Behandlung ($U \geq 1394$, $p \geq 0,2$) (Abb. 50). In der Behandlung mit der Kombination aus $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml und 0,064 ppm oder mit MA-7 allein wurden weniger Eier als in den Kontroll-Behandlungen und in der Fipronil-Behandlung abgelegt ($U \leq 1116$, $p \leq 0,004$). Die Kombination mit der höheren Fipronil-Konzentration verringerte die Eimenge im Vergleich zur Tween- bzw. DMSO-Kontrolle, und der Fipronil-Behandlung kaum ($U \geq 1338$, $p \geq 0,042$). Zwischen den Kombinationen und MA-7 allein gab es keine Unterschiede ($U \geq 1380$, $p \geq 0,097$). Beide Behandlungen mit $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml (allein und in Kombination mit 0,32 ppm) reduzierte die Menge der abgelegten Eier im Vergleich zu Tween, DMSO und Fipronil signifikant ($U \leq 740$, $p \leq 0,018$). Es gab aber keine Unterschiede zwischen der Behandlung mit der Kombination und MA-7 allein ($U = 517$, $p = 0,26$). Nur die abgelegte Eimenge der Weibchen, die mit der Kombination aus $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml MA-K und 0,32 ppm Fipronil behandelt wurden, wurde stärker verringert als die Eimenge von Weibchen, die mit der entsprechenden Kombination von MA-7 behandelt wurden ($U = 1315$, $p = 0,044$). Bei allen anderen Varianten gab es zwischen den beiden Pilzstämmen bezüglich der Eimenge keine Unterschiede ($U \geq 1387$, $p \geq 0,19$).

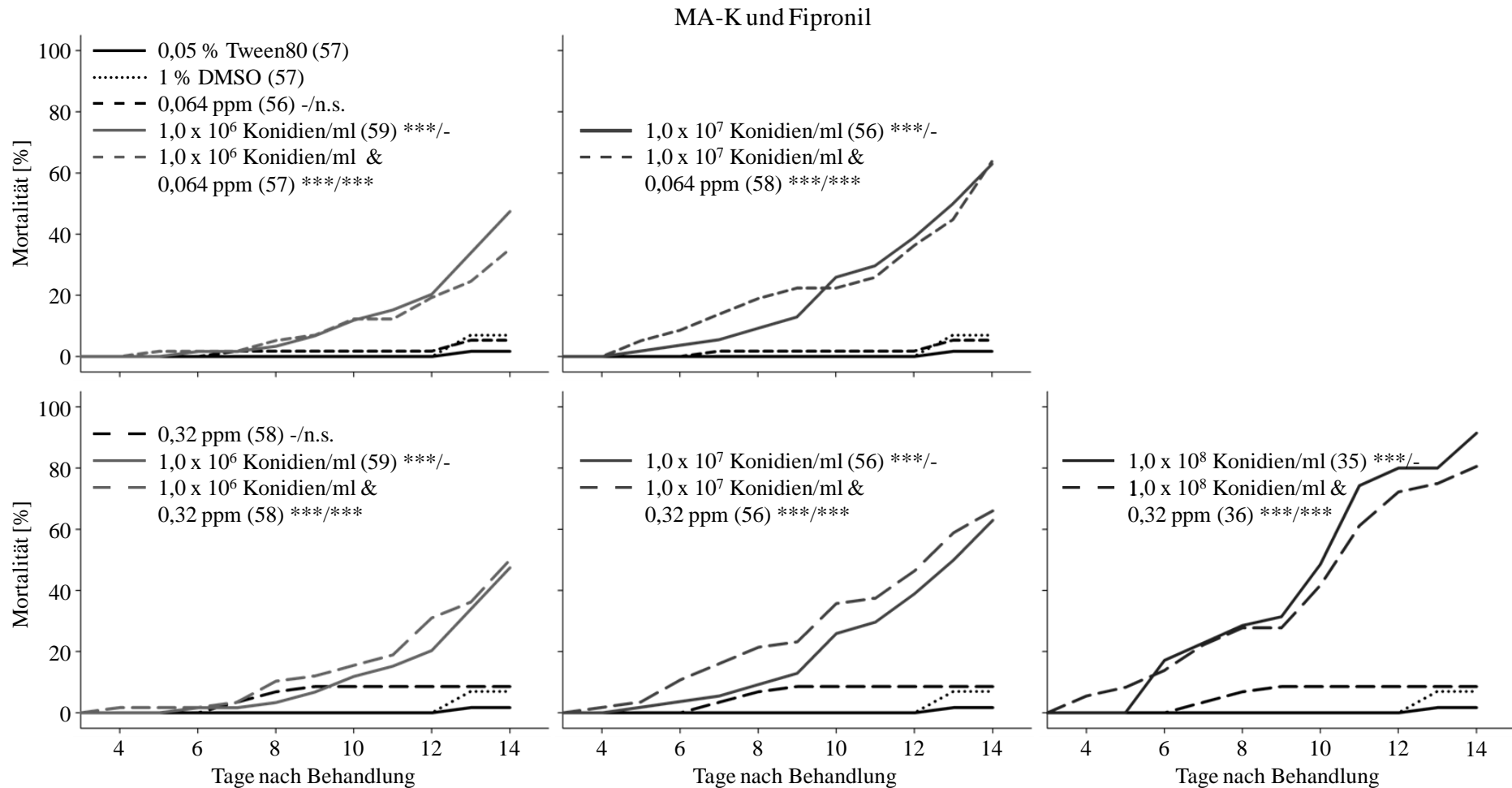


Abb. 47: Mortalität der vollgesogenen Weibchen von *R. microplus* über den Versuchszeitraum von 14 Tagen. Behandelt wurden die Weibchen mit $1,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von MA-K und mit 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO an (Log-Rang-Test mit $df = 1$) (n = siehe Werte in Klammern).

Tab. 16: χ^2 - und p-Werte des Log-Rang-Tests (df = 1) zur Mortalität der vollgesogenen Weibchen von *R. microplus* und die Chancenverhältnisse (CV) der Behandlungen zu den Kontrollen. Behandelt wurden die Weibchen mit $1,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von MA-K und mit 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Zusätzlich wurden für Behandlungen, die signifikant unterschiedlich zur Kontrolle waren, eine erwartete Mortalität (M_E) und ein χ^2 -Wert ($\chi^2_{(E)}$) berechnet, um den auftretenden Effekt für die signifikanten Interaktionen in den Kombinationsvarianten zu bestimmen.

Behandlung		Kontrolle	0,05 % Tween80			1 % DMSO			M_E	$\chi^2_{(E)}$	Effekt
			n	χ^2 -Wert	p-Wert	CV	χ^2 -Wert	p-Wert			
Fipronil [ppm]		0,064	56				0,1	0,733	0,8		
		0,32	58				0,2	0,693	1,3		
MA-K	$1,0 \times 10^6$		59	32,2	<0,001	50,6					
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^6$ &	0,064	57	21,0	<0,001	30,3	13,8	<0,001	7,2	50,3	4,6 antagonistisch
Fipronil [ppm]	$1,0 \times 10^6$ &	0,32	58	34,8	<0,001	56,0	26,6	<0,001	13,3	52,0	0,1 additiv
	$1,0 \times 10^7$		56	47,0	<0,001	86,5					
	$1,0 \times 10^7$ &	0,064	58	50,4	<0,001	98,7	41,3	<0,001	23,3	62,8	0,0 additiv
	$1,0 \times 10^7$ &	0,32	56	54,5	<0,001	109,1	46,2	<0,001	25,8	64,1	0,1 additiv
	$1,0 \times 10^8$		35	94,4	<0,001	597,3					
	$1,0 \times 10^8$ &	0,32	36	75,0	<0,001	232,0	67,4	<0,001	54,9	92,2	1,5 additiv

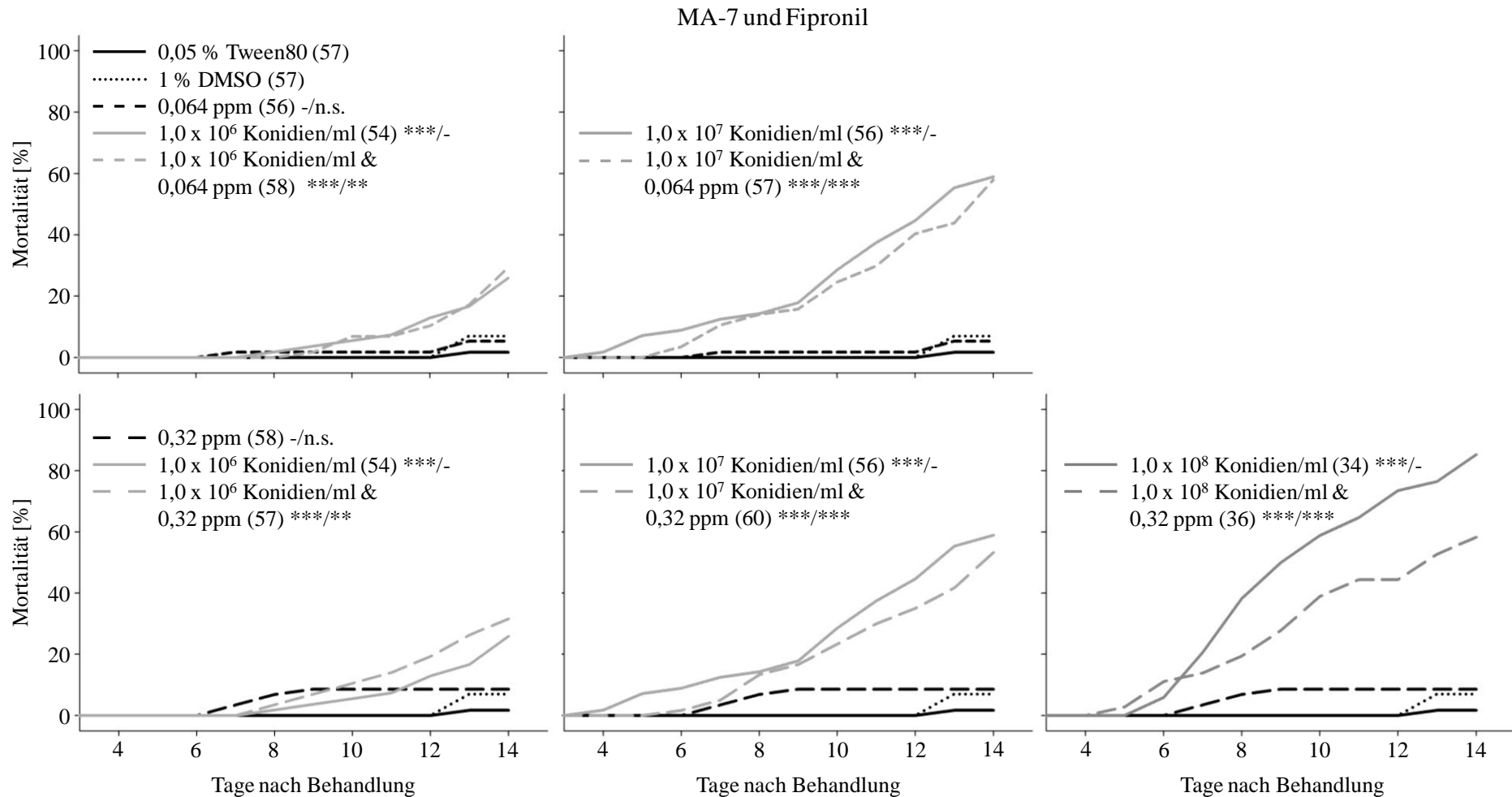


Abb. 48: Mortalität der vollgesogenen Weibchen von *R. microplus* über den Versuchszeitraum von 14 Tagen. Behandelt wurden die Weibchen mit $1,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von MA-7 und mit 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO an (Log-Rang-Test mit $df = 1$) ($n =$ siehe Werte in Klammern).

Tab. 17: χ^2 - und p-Werte des Log-Rang-Testes (df = 1) zur Mortalität der vollgesogenen Weibchen von *R. microplus* und die Chancenverhältnisse (CV) der Behandlungen zu den Kontrollen. Behandelt wurden die Weibchen mit $1,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von MA-7 und mit 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Zusätzlich wurde für Behandlungen, die signifikant unterschiedlich zur Kontrolle waren, eine erwartete Mortalität (M_E) und ein χ^2 -Wert ($\chi^2_{(E)}$) berechnet, um den auftretenden Effekt für die signifikanten Interaktionen in den Kombinationsvarianten zu bestimmen.

Behandlung		Kontrolle	0,05 % Tween80			1 % DMSO			M_E	$\chi^2_{(E)}$	Effekt	
			n	χ^2 -Wert	p-Wert	CV	χ^2 -Wert	p-Wert				CV
Fipronil [ppm]		0,064	56				0,1	0,733	0,8			
		0,32	58				0,2	0,693	1,3			
MA-7	$1,0 \times 10^6$		54	13,8	<0,001	19,6						
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^6$ &	0,064	58	16,5	<0,001	23,2	9,8	0,002	5,5	29,9	0,0	additiv
Fipronil [ppm]	$1,0 \times 10^6$ &	0,32	57	18,3	<0,001	25,8	11,6	0,001	6,1	32,3	0,0	additiv
	$1,0 \times 10^7$		56	45,4	<0,001	80,3						
	$1,0 \times 10^7$ &	0,064	57	43,6	<0,001	77,0	35,1	<0,001	18,2	61,1	0,2	additiv
	$1,0 \times 10^7$ &	0,32	60	38,7	<0,001	64,0	30,5	<0,001	15,1	62,5	1,3	additiv
	$1,0 \times 10^8$		34	84,1	<0,001	324,8						
	$1,0 \times 10^8$ &	0,32	36	43,3	<0,001	78,4	34,6	<0,001	18,6	86,6	9,2	antagonistisch

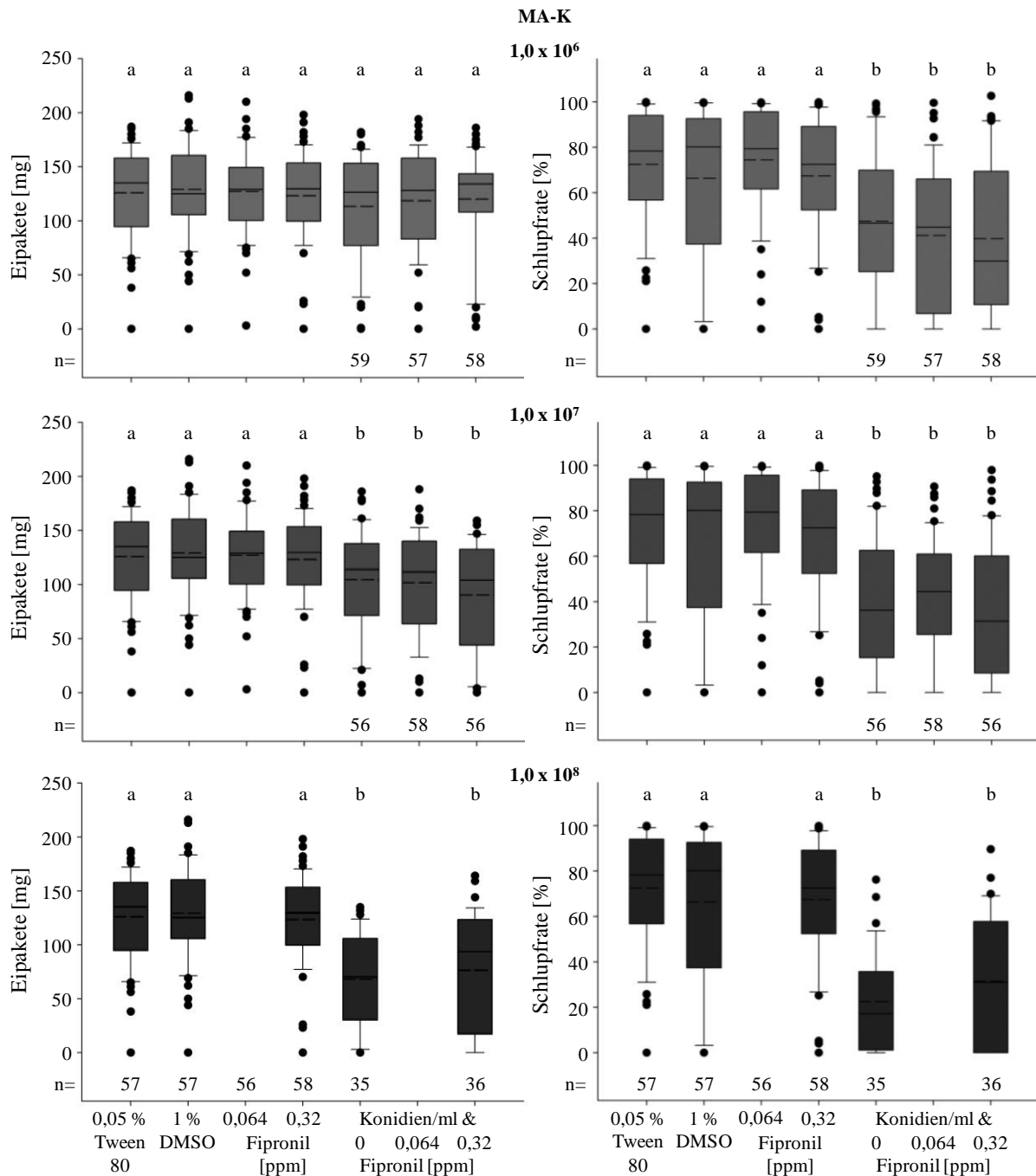


Abb. 49: Verteilung der Eigewichte und Schlupfraten von *R. microplus*. Behandelt wurden die Weibchen mit $1,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von MA-K und mit 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollsubstanzen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Boxplots zeigen den Median (durchgezogene Linie), den Mittelwert (gestrichelte Linie), die 25/75 Perzentile und die 10/90 Perzentile an, Punkte die Ausreißer. Boxplots mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich (U-Test nach Mann und Whitney).

Werden die Eipakete von Weibchen, die innerhalb des Versuchszeitraum gestorben waren, nicht mit ausgewertet, zeichnet sich ab, dass sich nur die Behandlung mit der Kombination aus $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml MA-K und 0,064 ppm Fipronil von der Behandlung mit Tween, DMSO und MA-K allein (tendenziell) unterschied ($U \leq 439$, $p \leq 0,088$). Außerdem legten die

Weibchen, die mit $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-7 und 0,064 ppm Fipronil behandelt wurden, im Vergleich zu denen, die mit MA-7 allein behandelt wurden, weniger Eier ab ($U = 606$, $p = 0,043$). Bei allen anderen Varianten konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, wenn die Eimenge der gestorbenen Weibchen nicht mit einbezogen wurden ($U \geq 421$, $p \geq 0,10$).

4.3.3.1.1.2 Schlupfrate

Der Anteil der Larven, die aus den abgelegten Eiern schlüpften, betrug $72,0 \pm 24,34$ % bzw. $65,9 \pm 33,52$ % in der Tween- bzw. DMSO-Kontrolle (Abb. 49). Der Anteil der geschlüpften Larven unterschied sich in den Ansätzen mit 0,05 % Tween80, 1 % DMSO und Fipronil (0,064 ppm oder 0,32 ppm) nicht ($U \geq 1387$, $p \geq 0,29$).

MA-K und Fipronil

In allen Behandlungen mit MA-K allein und in den Kombinationen war die Schlupfrate signifikant geringer als in der Tween- oder DMSO-Kontrolle ($U \leq 1009$, $p \leq 0,001$) (Abb. 49). Die Schlupfrate in den Kombinationen war auch signifikant geringer als die in den Fipronil-Behandlungen ($U \leq 855$, $p < 0,001$). Zwischen der Schlupfrate in den Kombinationen und der in den entsprechenden MA-K-Konzentrationen gab es aber keine Unterschiede ($U \geq 1403$, $p \geq 0,16$).

MA-7 und Fipronil

Die Schlupfrate in den Behandlungen mit $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-7 allein oder in Kombination war signifikant niedriger als in den Kontrollen und den Fipronil-Behandlungen ($U \leq 801,5$, $p < 0,001$) (Abb. 50). Zwischen den drei Varianten gab es aber bezüglich der Schlupfrate keine Unterschiede ($U \geq 1356$, $p \geq 0,17$). Auch in den Behandlungen mit den höheren MA-7-Konzentrationen ($1,0 \times 10^7$ und $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml) reduzierte sich die Schlupfrate signifikant gegenüber den Kontrollen und den Fipronil-Behandlungen ($U \leq 501,5$, $p < 0,001$). Der Vergleich der Schlupfraten der drei MA-7-Varianten ergab keine Unterschiede ($U \geq 1278$, $p \geq 0,42$).

Der Anteil der geschlüpften Larven war in den Behandlungen mit $1,0 \times 10^6$ sowie bei $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml allein und in Kombination mit 0,064 ppm oder 0,32 ppm Fipronil bei MA-7 geringer als in den MA-K-Behandlungen ($U \leq 1136$, $p \leq 0,025$). Bei allen anderen Varianten gab es zwischen den beiden Pilzstämmen keine Unterschiede bezüglich der Schlupfrate ($U \geq 1396$, $p \geq 0,19$).

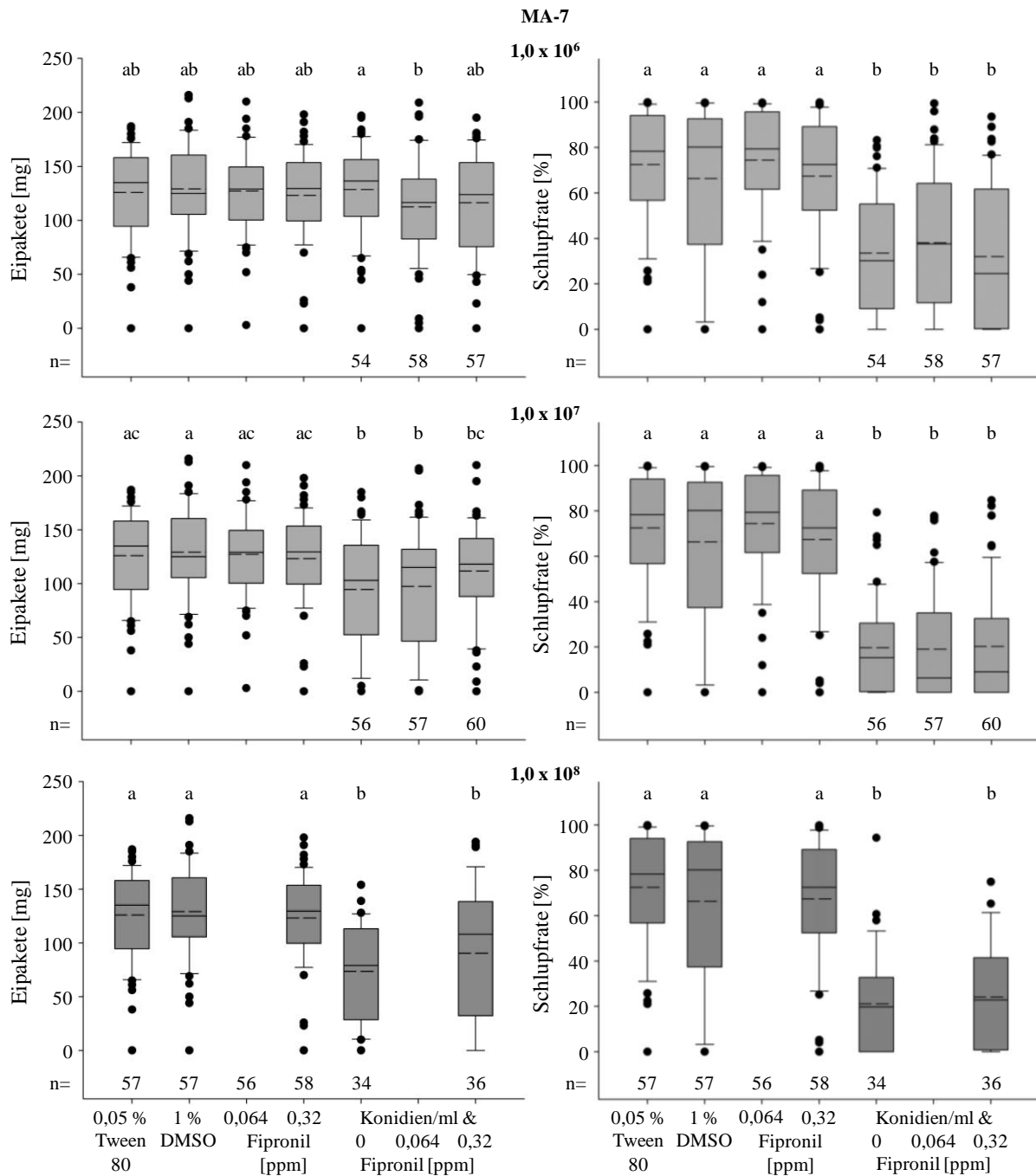


Abb. 50: Verteilung der Eigewichte und Schlupfraten von *R. microplus*. Behandelt wurden die Weibchen mit $1,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von MA-7 und mit 0,064 oder 0,32 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollsubstanzen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Boxplots zeigen den Median (durchgezogene Linie), den Mittelwert (gestrichelte Linie), die 25/75 Perzentile und die 10/90 Perzentile an, Punkte die Ausreißer. Boxplots mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich (U-Test nach Mann und Whitney).

Für die Berechnung der Schlupfrate machte es keinen Unterschied, ob die Eier von Weibchen, die innerhalb des Versuchszeitraums gestorben waren, in die Auswertung mit einbezogen wurden oder nicht. Die Schlupfraten in allen Behandlungen mit Pilz waren signifikant niedriger als die in den Kontrollen und den Fipronil-Behandlungen ($U \leq 565$, $p \leq 0,10$), auch

wenn nur Eier von Weibchen, die bis zum Ende des Versuches noch am Leben waren, mit einbezogen wurden.

4.3.3.1.2 *M. anisopliae* und Amitraz

4.3.3.1.2.1 Mortalität

In der Tween- und in der DMSO- Kontrolle starben 2 % bzw. 7 % der Weibchen innerhalb von 14 Tagen. Die Mortalitäten in den Amitraz-Behandlungen lagen bei 9 % (0,32 ppm) bzw. 14 % (1,6 ppm) und unterschieden sich nicht von der Mortalität in der DMSO-Kontrolle ($\chi^2 \leq 1,5$, $p \geq 0,21$).

MA-K und Amitraz

MA-K allein (oder in Kombination mit Amitraz) verursachte eine signifikant höhere Mortalität als die Tween-Kontrolle (und die DMSO-Kontrolle) ($\chi^2 \geq 21,7$, $p < 0,001$) (Abb. 51). Die Chancenverhältnisse der MA-K-Amitraz-Kombinationen waren drei- bis siebenmal höher als die jeweilige Amitraz-Konzentration allein (Tab. 18). Die Chancenverhältnisse der Kombinationen aus $1,0 \times 10^6$ und $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von MA-K und Amitraz waren aber geringer als die von MA-K allein. Die Chancenverhältnisse der Kombinationen von $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml und Amitraz waren deutlich höher als das von MA-K allein (Tab. 18). Trotz der niedrigen Chancenverhältnisse war nur die Interaktion von $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml und 1,6 ppm Amitraz antagonistisch. Für alle anderen Kombinationen waren die Interaktionen (noch) additiv.

MA-7 und Amitraz

Auch alle Behandlungen mit MA-7 wiesen eine signifikant höhere Mortalität als die Tween- und DMSO-Kontrolle auf ($\chi^2 \geq 30,0$, $p < 0,001$) (Abb. 52). Die Chancenverhältnisse der MA-7-Amitraz-Kombinationen waren mehr als siebenmal höher als die jeweiligen Amitraz-Behandlungen (Tab. 19). Die Chancenverhältnisse der beiden Kombinationen aus $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-7 und Amitraz waren deutlich höher als das Chancenverhältnis von MA-7 allein. Die Chancenverhältnisse der Kombinationen mit $1,0 \times 10^7$ und $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml hatten aber ein deutlich niedrigeres Chancenverhältnis als das von MA-7 allein (Tab. 19). Die Interaktionen von $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-7 und beiden Amitraz-Konzentrationen waren synergistisch. Alle anderen Kombinationen wiesen additive Effekte gegenüber den vollgesogenen Weibchen auf.

Im Vergleich verursachte die Behandlung mit $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-7 allein oder in Kombination mit 1,6 ppm sowie die Kombination von $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml MA-7 mit 1,6 ppm eine geringere Mortalität als die Behandlung mit Kombinationen der entsprechenden MA-K-Konzentrationen ($\chi^2 \geq 5,5$, $p \leq 0,019$). Alle anderen Varianten wiesen ähnliche Mortalitäten auf ($\chi^2 \leq 1,6$, $p \geq 0,21$).

4.3.3.1.2.2 Eiablage

Weibchen, die mit 0,05 % Tween80 oder 1 % DMSO behandelt wurden, legten $125,8 \pm 41,34$ mg bzw. $129,1 \pm 43,11$ mg Eier ab (Abb. 53). Die Eimenge in den Behandlungen von 0,05 % Tween80, 1 % DMSO oder 0,32 ppm Amitraz unterschied sich nicht ($U \geq 1305$, $p \geq 0,17$). Die Behandlung mit 1,6 ppm reduzierte die Eimenge im Vergleich zur Kontrolle ($U \leq 292$, $p < 0,001$).

MA-K und Amitraz

Die abgelegten Eimengen der Weibchen, die mit $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K allein oder in Kombination mit 0,32 ppm Amitraz behandelt wurden, waren vergleichbar mit den Eimengen der Weibchen in den Tween-, DMSO- oder Amitraz-Behandlungen ($U \geq 1392$, $p \geq 0,083$). Auch zwischen der MA-K-Behandlung allein und der Kombination mit 0,32 ppm gab es keinen Unterschied ($U = 1642$, $p = 0,50$). Weibchen, die mit der Kombination von $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K und 1,6 ppm Amitraz behandelt wurden, legten weniger Eier als die in der Tween-, DMSO-Kontrolle oder in der MA-K-Behandlung ab, aber mehr als die, die mit 1,6 ppm Amitraz allein behandelt wurden ($U = 969$, $p < 0,001$ [Kontrolle], $U = 1217$, $p = 0,021$ [MA-K] $U = 566$, $p < 0,001$ [1,6 ppm]). Nach Behandlung mit $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml MA-K allein oder mit den beiden Kombinationen wurden weniger Eier abgelegt als nach Behandlung mit Tween oder DMSO ($U \leq 1158$, $p \leq 0,012$). Einen Unterschied in der Eimenge der Kombination ($1,0 \times 10^7$ Konidien/ml mit 0,32 ppm) und der Behandlung mit 0,32 ppm gab es nicht ($U \geq 1208$, $p \geq 0,124$). Nur die Kombination aus $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml mit der höheren Amitraz-Konzentration (1,6 ppm) reduzierte die Eimenge im Vergleich zur MA-K-Behandlung ($U = 898$, $p < 0,001$), aber nicht im Vergleich zur Amitraz-Behandlung ($U = 1488$, $p = 0,28$). Die Behandlung mit $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml MA-K allein oder in Kombination mit 1,6 ppm Amitraz reduzierte die Eiablage im Vergleich mit der Tween- oder DMSO-Behandlung ($U \leq 348$, $p < 0,001$). Ein Unterschied zwischen der Kombination und Amitraz bzw. MA-K gab es aber nicht ($U \geq 520$, $p \geq 0,27$).

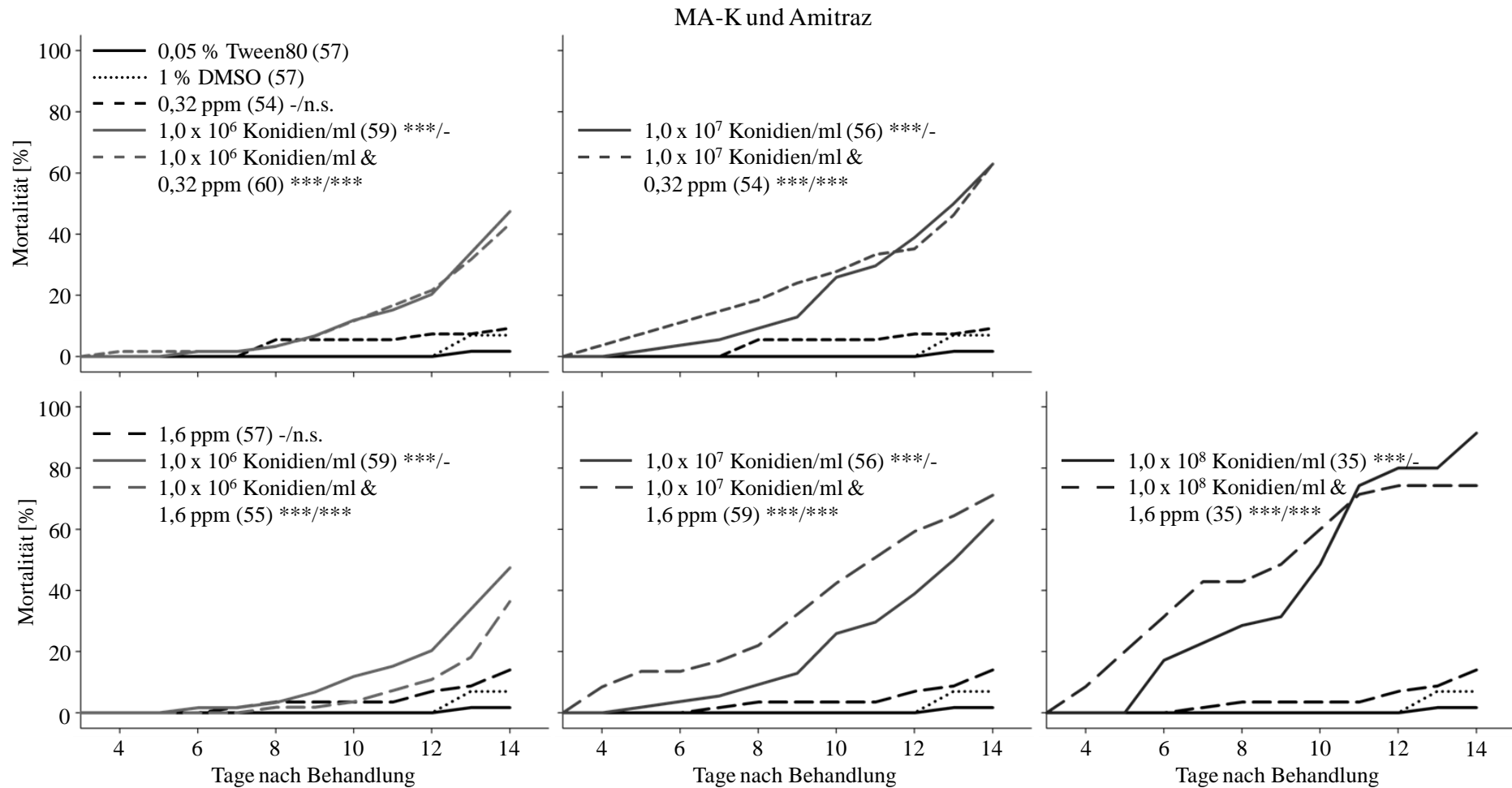


Abb. 51: Mortalität der vollgesogenen Weibchen von *R. microplus* über den Versuchszeitraum von 14 Tagen. Behandelt wurden die Weibchen mit $1,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von MA-K und mit 0,32 ppm oder 1,6 ppm Amitraz allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO an (Log-Rang-Test mit $df = 1$) (n = siehe Werte in Klammern).

Tab. 18: χ^2 - und p-Werte des Log-Rang-Tests (df = 1) zur Mortalität der vollgesogenen Weibchen von *R. microplus* und die Chancenverhältnisse (CV) der Behandlungen zu den Kontrollen. Behandelt wurden die Weibchen mit $1,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von MA-K und mit 0,32 oder 1,6 ppm Amitraz allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Zusätzlich wurden für Behandlungen, die signifikant unterschiedlich zur Kontrolle waren, eine erwartete Mortalität (M_E) und ein χ^2 -Wert ($\chi^2_{(E)}$) berechnet, um den auftretenden Effekt für die signifikanten Interaktionen in den Kombinationsvarianten zu bestimmen.

Behandlung	Kontrolle	0,05 % Tween80		1 % DMSO			M_E	$\chi^2_{(E)}$	Effekt		
		n	χ^2 -Wert	p-Wert	CV	χ^2 -Wert				p-Wert	CV
Amitraz [ppm]	0,32	54			0,2	0,631	1,4				
	1,6	57			1,5	0,214	2,2				
MA-K	$1,0 \times 10^6$	59	32,2	<0,001	50,6						
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^6$ & 0,32	60	28,4	<0,001	42,8	20,6	<0,001	10,1	52,3	1,6	additiv
Amitraz [ppm]	$1,0 \times 10^6$ & 1,6	55	21,7	<0,001	32,0	13,9	<0,001	7,6	54,9	6,2	antagonistisch
	$1,0 \times 10^7$	56	47,0	<0,001	86,5						
	$1,0 \times 10^7$ & 0,32	54	49,3	<0,001	95,2	40,2	<0,001	22,5	66,4	0,2	additiv
	$1,0 \times 10^7$ & 1,6	59	62,8	<0,001	138,4	54,9	<0,001	32,7	68,2	0,1	additiv
	$1,0 \times 10^8$	35	94,4	<0,001	597,3						
	$1,0 \times 10^8$ & 1,6	35	65,3	<0,001	161,8	58,7	<0,001	38,3	92,6	3,6	additiv

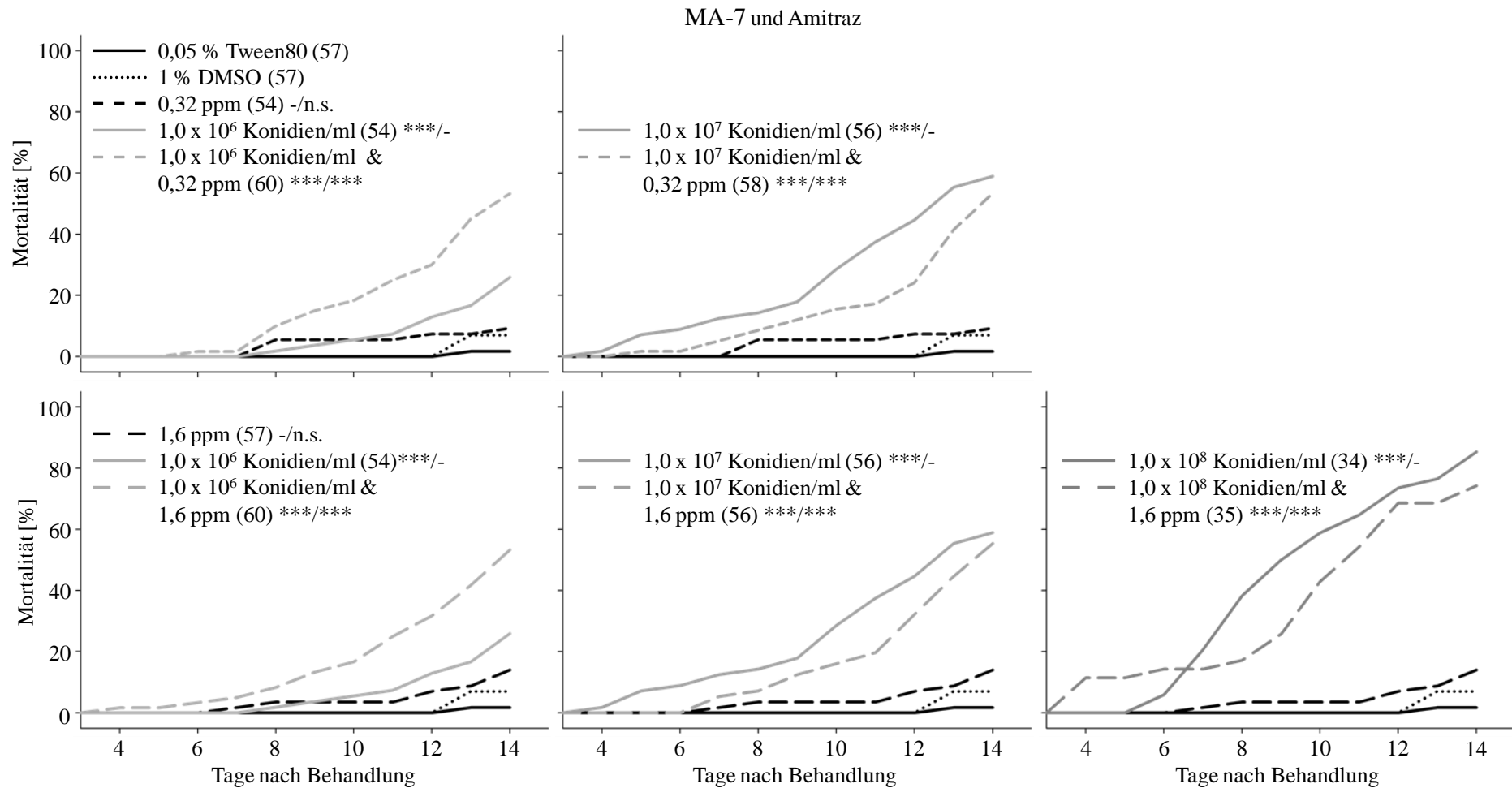


Abb. 52: Mortalität der vollgesogenen Weibchen von *R. microplus* über den Versuchszeitraum von 14 Tagen. Behandelt wurden die Weibchen mit 1,0 x 10⁶, 1,0 x 10⁷ oder 1,0 x 10⁸ Konidien/ml von MA-7 und mit 0,32 ppm oder 1,6 ppm Amitraz allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO an (Log-Rang-Test mit df = 1) (n = siehe Werte in Klammern).

Tab. 19: χ^2 - und p-Werte des Log-Rang-Tests (df = 1) zur Mortalität der vollgesogenen Weibchen von *R. microplus* und die Chancenverhältnisse (CV) der Behandlungen zu den Kontrollen. Behandelt wurden die Weibchen mit $1,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von MA-7 und mit 0,32 oder 1,6 ppm Amitraz allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Zusätzlich wurden für Behandlungen, die signifikant unterschiedlich zur Kontrolle waren, eine erwartete Mortalität (M_E) und ein χ^2 -Wert ($\chi^2_{(E)}$) berechnet, um den auftretenden Effekt für die signifikanten Interaktionen in den Kombinationsvarianten zu bestimmen.

Behandlung	Kontrolle	0,05 % Tween80			1 % DMSO			M_E	$\chi^2_{(E)}$	Effekt
		n	χ^2 -Wert	p-Wert	CV	χ^2 -Wert	p-Wert			
Amitraz [ppm]	0,32	54				0,2	0,631	1,4		
	1,6	57				1,5	0,214	2,2		
MA-7	$1,0 \times 10^6$	54	13,8	<0,001	19,6					
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^6$ & 0,32	60	38,7	<0,001	64,0	30,6	<0,001	15,1	32,8	12,8 synergistisch
Amitraz [ppm]	$1,0 \times 10^6$ & 1,6	60	42,4	<0,001	73,2	34,1	<0,001	17,3	36,3	8,0 synergistisch
	$1,0 \times 10^7$	56	45,4	<0,001	80,3					
	$1,0 \times 10^7$ & 0,32	58	38,4	<0,001	64,3	30,0	<0,001	15,2	62,7	1,4 additiv
	$1,0 \times 10^7$ & 1,6	56	40,7	<0,001	69,4	32,3	<0,001	16,4	64,7	1,3 additiv
	$1,0 \times 10^8$	34	84,1	<0,001	324,8					
	$1,0 \times 10^8$ & 1,6	35	64,3	<0,001	161,8	56,6	<0,001	38,3	87,4	2,0 additiv

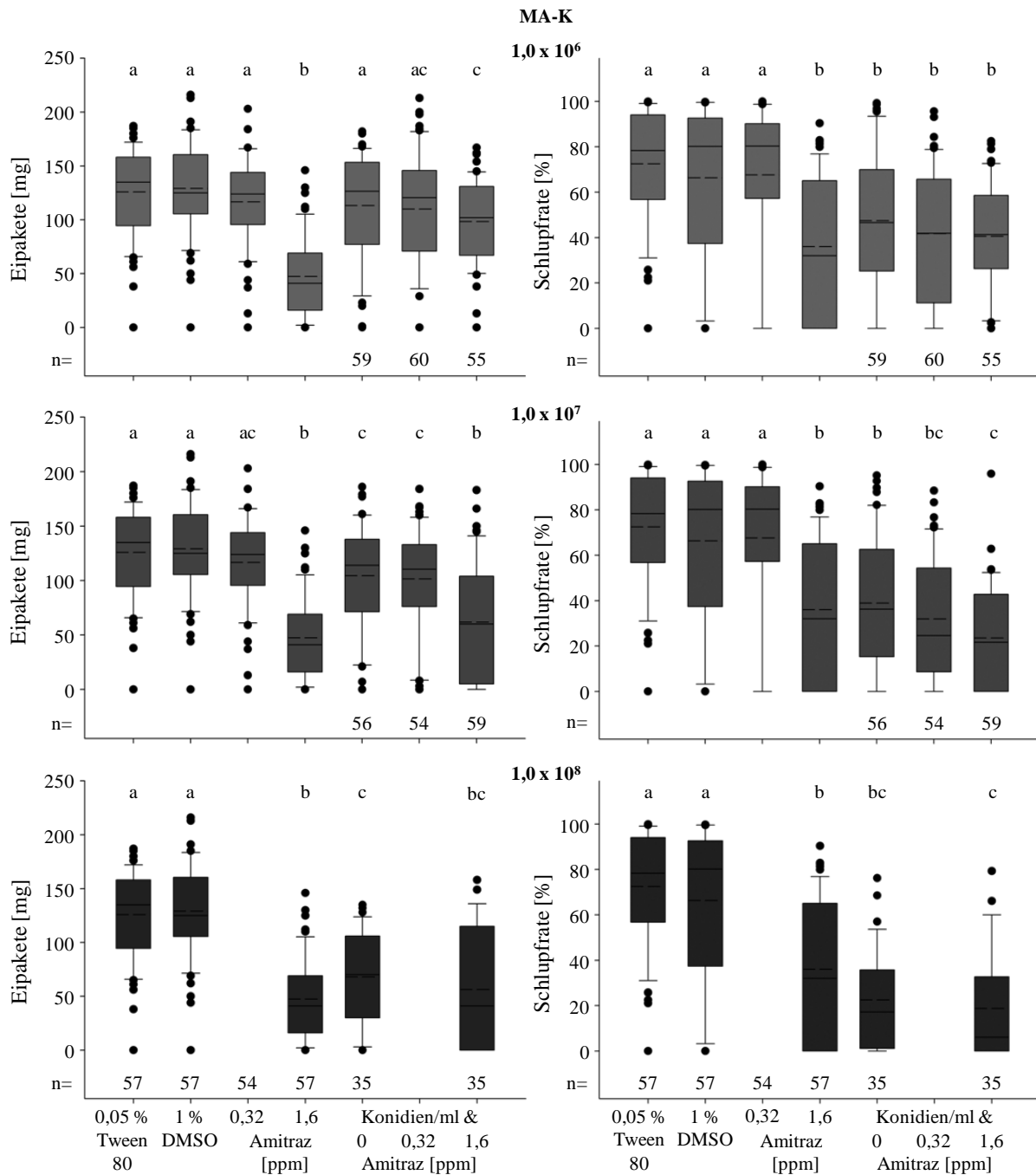


Abb. 53: Verteilung der Eigewichte und Schlupfraten von *R. microplus*. Behandelt wurden die Weibchen mit $1,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von MA-K und mit 0,32 oder 1,6 ppm Amitraz allein und in Kombination. Als Kontrollsubstanzen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Boxplots zeigen den Median (durchgezogene Linie), den Mittelwert (gestrichelte Linie), die 25/75 Perzentile und die 10/90 Perzentile an, Punkte die Ausreißer. Boxplots mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich (U-Test nach Mann und Whitney).

MA-7 und Amitraz

Die Behandlung mit $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-7 allein oder in Kombination mit 0,32 ppm beeinflusste die abgelegte Eimenge im Vergleich zu den Kontrollen nicht ($U \geq 1394$, $p \geq 0,084$). Es gab auch keinen Unterschied zwischen der Kombination und der Amitraz-

Behandlung ($U = 1548$, $p = 0,68$) (Abb. 54). In der Kombination aus $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml und 1,6 ppm wurden weniger Eier abgelegt als in den Kontrollen ($U \leq 869$, $p < 0,001$), aber mehr als in der Amitraz-Behandlung ($U = 1006$, $p < 0,001$). In beiden Kombinationen wurden signifikant weniger Eier abgelegt als in der Behandlung mit MA-7 allein ($U \leq 1264$, $p \leq 0,043$). Nach Behandlung mit $1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml MA-7 allein oder in Kombination mit 1,6 ppm wurden weniger Eier gelegt als in den Kontrollen ($U \leq 1025$, $p < 0,001$), aber mehr als in der Amitraz-Behandlung ($U \leq 715,5$, $p \leq 0,023$). Die Eimenge in der Kombination mit 0,32 ppm war hingegen der in den Kontrollen ähnlich und nicht verschieden zu der in der Amitraz-Behandlung ($U \geq 1338$, $p \geq 0,078$). Zwischen den Kombinationen und MA-7 allein gab es keine Unterschiede ($U \geq 1316$, $p \geq 0,08$) (Abb. 54).

Im Vergleich der beiden *M. anisopliae*-Stämme legten nur Weibchen, die mit der Kombination aus $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml MA-K und 1,6 ppm behandelt wurden, weniger Eier ab als die mit einer Kombination aus entsprechender Konzentration von MA-7 und 1,6 ppm behandelten Weibchen ($U = 1014$, $p < 0,001$). Bei allen anderen Varianten gab es keine Unterschiede zwischen den beiden *M. anisopliae*-Stämmen ($U \geq 1366$, $p \geq 0,11$).

Werden die Eipakete von Weibchen, die innerhalb des Versuchszeitraums gestorben waren, nicht in die Auswertung mit einbezogen, zeichnet sich ab, dass sich die abgelegte Eimenge nur in Behandlungen mit 1,6 ppm Amitraz allein oder in Kombination mit *M. anisopliae* von den anderen Behandlungen unterschied ($U \leq 117$, $p \leq 0,045$). Alle anderen Behandlungen wiesen dagegen in etwa gleiche Mengen an abgelegten Eiern auf ($U \geq 347$, $p \geq 0,091$).

4.3.3.1.2.3 Schlupfrate

Der Anteil der Larven, die aus den abgelegten Eiern geschlüpft waren, betrug $72,0 \pm 24,34$ % bzw. $65,9 \pm 33,52$ % in der Tween- bzw. DMSO-Kontrolle (Abb. 53). Der Anteil der geschlüpften Larven unterschied sich in den Ansätzen von 0,05 % Tween80, 1 % DMSO und 0,32 ppm Amitraz nicht ($U \geq 1430$, $p \geq 0,74$). Es schlüpften jedoch signifikant weniger Larven aus dem Ansatz mit 1,6 ppm ($U \leq 695$, $p < 0,001$).

MA-K und Amitraz

Der Anteil der geschlüpften Larven in den Ansätzen von MA-K allein ($1,0 \times 10^6$ – $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml) und in Kombination mit 0,32 ppm oder 1,6 ppm Amitraz war geringer als der in der Tween- und DMSO-Behandlung ($U \leq 1009$, $p < 0,001$). Es schlüpften auch weniger Larven in den Kombinationsbehandlungen als in den Amitraz-Behandlungen ($U \leq 1045$,

$p \leq 0,046$). Es schlüpften aber nur signifikant weniger Larven in der Kombinationsbehandlung von $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml mit 1,6 ppm Amitraz als in der MA-K-Behandlung ($U = 916$, $p = 0,007$). Die Schlupfraten in den anderen Kombinationsbehandlungen entsprachen denen der MA-K-Behandlungen ($U \geq 1182$, $p \geq 0,21$).

MA-7 und Amitraz

Die Schlupfraten der Larven in den Versuchsansätzen mit $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-7 allein und in Kombination waren geringer als die in der Behandlung mit Tween, DMSO und 0,32 ppm Amitraz ($U \leq 803$, $p < 0,001$). Die Schlupfrate der Kombination mit 1,6 ppm und Amitraz allein war nicht unterschiedlich ($U = 1408$, $p = 0,52$). Auch unterschieden sich die Schlupfraten in Behandlungen mit verschiedenen MA-7-Varianten nicht untereinander ($U \geq 1328$, $p \geq 0,4$) (Abb. 54). Der Anteil der geschlüpften Larven war in der Behandlung mit $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml MA-7 allein und in den Kombinationsbehandlungen mit 0,32 ppm und 1,6 ppm Amitraz deutlich geringer als in der Tween- oder DMSO-Kontrolle und der Amitraz-Behandlung ($U \leq 1088$, $p \leq 0,01$). Es gab aber keinen Unterschied zwischen den Schlupfraten in den Kombinationen und in der MA-7-Behandlung ($U \geq 1334$, $p \geq 0,29$). Die Schlupfrate wurde von $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml MA-7 mit oder ohne 1,6 ppm Amitraz gegenüber den Kontrollen reduziert ($U \leq 324$, $p < 0,001$). Der Larvenschlupf in der Kombinationsbehandlung war auch geringer als in der Amitraz- und tendenziell geringer als in der MA-7-Behandlung ($U = 464$, $p < 0,001$ [Amitraz], $U = 360$, $p = 0,052$ [MA-7]) (Abb. 54).

Der Anteil der geschlüpften Larven war nur in den Behandlungen mit $1,0 \times 10^6$ (allein oder in Kombination mit 1,6 ppm Amitraz) und mit $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml MA-7 (tendenziell) geringer als in den Behandlungen mit den entsprechenden MA-K-Konzentrationen ($U \leq 1166$, $p \leq 0,072$). Bei allen anderen Varianten gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Pilzstämmen ($U \geq 1356$, $p \geq 0,21$).

Für die Schlupfrate machte es keinen Unterschied, ob die Eier von Weibchen, die im Versuchszeitraum gestorben waren, in die Auswertung mit einbezogen wurden oder nicht. Die Schlupfraten in allen Behandlungen mit Pilz waren signifikant niedriger als die in den Kontrollen und den Amitraz-Behandlungen ($U \leq 565$, $p \leq 0,10$).

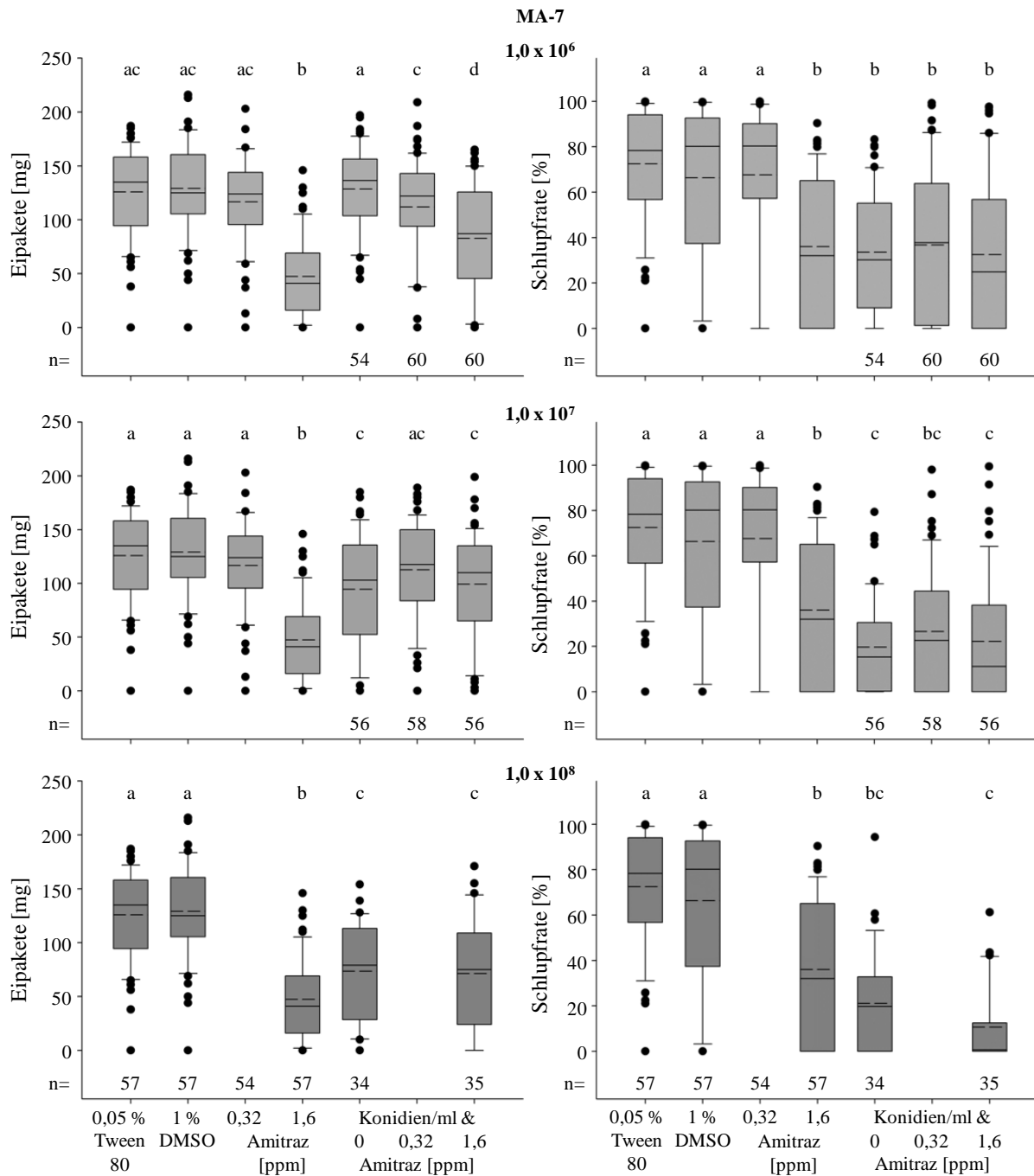


Abb. 54: Verteilung der Eigewichte und Schlupfraten von *R. microplus*. Behandelt wurden die Weibchen mit $1,0 \times 10^6$, $1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von MA-7 und mit 0,32 oder 1,6 ppm Amitraz allein und in Kombination. Als Kontrollsubstanzen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Boxplots zeigen den Median (durchgezogene Linie), den Mittelwert (gestrichelte Linie), die 25/75 Perzentile und die 10/90 Perzentile an, Punkte die Ausreißer. Boxplots mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant unterschiedlich (U-Test nach Mann und Whitney).

4.3.3.2 Eier

4.3.3.2.1 *M. anisopliae* und Fipronil

4.3.3.2.1.1 MA-K und Fipronil

Nach Behandlung der Eier trat in einem Teil der Ansätze mit MA-K (allein oder in Kombination mit Fipronil) zwischen dem 14. und 23. Tag nach der Behandlung Pilzauswuchs auf. Es gab zwischen den einzelnen Varianten bezüglich der Geschwindigkeit des MA-K-Auswuchses aber keine Unterschiede ($U \geq 0$, $p \geq 0,2$).

Der Larvenschlupf begann in der Kontrolle nach $27,2 \pm 2,79$ (0,05 % Tween80) bzw. $27,6 \pm 2,88$ Tagen (1 % DMSO) und dauerte $8,3 \pm 2,07$ bzw. $8,6 \pm 2,19$ Tage (Tab. 20). Weder der Zeitpunkt des Schlupfbeginns noch die Schlupfdauer wurde im Vergleich zu den Kontrollen signifikant von einer der gewählten MA-K- bzw. Fipronil-Konzentrationen allein oder in Kombination beeinflusst ($U \geq 4,0$, $p \geq 0,19$) (Tab. 20).

Tab. 20: Beginn ($\bar{x} \pm s$) des Larvenschlupfs von *R. microplus* in Tagen nach der Behandlung [TnB] und die Schlupfdauer ($\bar{x} \pm s$) in Tagen [T]. Behandelt wurden die Eier mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-K bzw. mit $1,0 \times 10^2$ oder $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml von MA-7 und mit 0,32 oder 1,6 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollsubstanzen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (U-Test nach Mann und Whitney) ($n = 4$).

Behandlung		Schlupf	
		Beginn [TnB]	Dauer [T]
Kontrolle	0,05 % Tween80	$27,2 \pm 2,79$ a	$8,3 \pm 2,07$ a
	1 % DMSO	$27,6 \pm 2,88$ a	$8,6 \pm 2,19$ a
Fipronil [ppm]	0,32	$28,5 \pm 3,83$ a	$8,0 \pm 1,55$ a
	1,6	$27,2 \pm 2,79$ a	$9,3 \pm 2,89$ a
MA-K	$1,0 \times 10^5$	$31,0 \pm 4,24$ a	$7,8 \pm 2,87$ a
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^5$ & 0,32	$29,0 \pm 2,00$ a	$8,3 \pm 3,40$ a
Fipronil [ppm]	$1,0 \times 10^5$ & 1,6	$30,3 \pm 3,50$ a	$8,5 \pm 1,73$ a
	$1,0 \times 10^6$	$28,3 \pm 5,19$ a	$10,5 \pm 2,89$ a
	$1,0 \times 10^6$ & 0,32	$28,3 \pm 5,19$ a	$9,0 \pm 2,31$ a
	$1,0 \times 10^6$ & 1,6	$26,3 \pm 3,50$ a	$11,0 \pm 0,00$ a
MA-7	$1,0 \times 10^2$	$31,0 \pm 4,24$ a	$6,3 \pm 1,50$ a
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^2$ & 0,32	$29,3 \pm 3,40$ a	$8,0 \pm 2,00$ a
Fipronil [ppm]	$1,0 \times 10^2$ & 1,6	$29,3 \pm 3,40$ a	$9,8 \pm 3,40$ a
	$1,0 \times 10^3$	$31,0 \pm 4,24$ a	$7,8 \pm 2,87$ a
	$1,0 \times 10^3$ & 0,32	$29,3 \pm 3,40$ a	$8,0 \pm 2,00$ a
	$1,0 \times 10^3$ & 1,6	$29,3 \pm 3,40$ a	$8,8 \pm 2,06$ a

Es schlüpften $66,8 \pm 21,70$ % bzw. $64,8 \pm 33,34$ % der Larven aus den Eiern, die mit 0,05 % Tween80 bzw. 1 % DMSO behandelt worden waren (Abb. 55). Zwischen 0,32 ppm Fipronil und der DMSO-Kontrolle gab es keine Unterschiede ($U = 8,5$, $p = 0,13$). Es schlüpften aber weniger Larven, wenn die Eier mit 1,6 ppm Fipronil behandelt wurden ($U = 5,5$, $p = 0,04$).

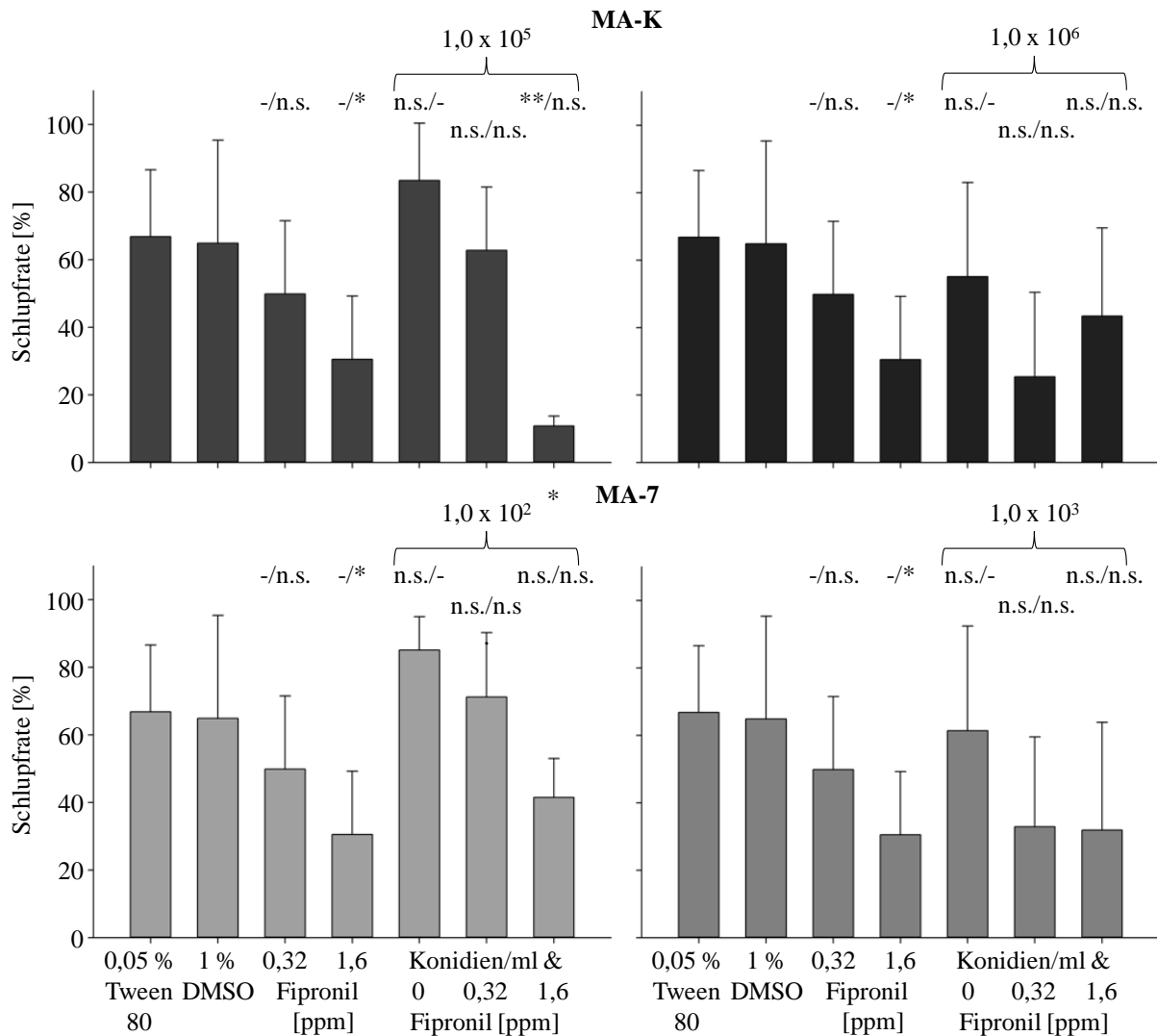


Abb. 55: Schlupfrate ($\bar{x} \pm s$) der Larven von *R. microplus* nach 42 Tagen. Behandelt wurden die Eier mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-K bzw. mit $1,0 \times 10^2$ oder $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml von MA-7 und mit 0,32 oder 1,6 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollsubstanzen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen über den Balken zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO an (Log-Rang-Test). Sternchen zwischen den Abbildungen zeigen Unterschiede zwischen MA-K und MA-7 an (U-Test nach Mann und Whitney) ($n = 4$).

Die Schlupfraten der Eier wurden von MA-K allein im Vergleich zur Tween-Kontrolle nicht beeinträchtigt ($U \geq 5,0$, $p \geq 0,17$). Auch die Kombination aus $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml MA-K und 0,32 ppm hatte keinen Einfluss auf die Schlupfrate ($U \geq 9,5$, $p \geq 0,61$). Die Schlupfrate der Kombination von $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml und 1,6 ppm war geringer als die in der Tween-

Kontrolle ($U = 0,0$, $p = 0,01$), aber gleich mit der in der DMSO-Kontrolle ($U = 4,0$, $p = 0,11$). Die Kombination aus $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K und 0,32 ppm hatte eine tendenziell geringere Schlupfrate als die Tween- bzw. die DMSO-Kontrolle ($U \geq 3,0$, $p = 0,067$). Die Kombination aus $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml und 1,6 ppm unterschied sich nicht von den Kontrollen ($U = 7,0$, $p = 0,35$). Die Chancenverhältnisse zu Tween waren für alle Kombinationen leicht höher als die der MA-K-Behandlungen (Tab. 21). Allerdings waren die Chancenverhältnisse zu DMSO nur für die Kombinationen aus $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml MA-K und 1,6 ppm sowie $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K und 0,32 ppm höher als die Chancenverhältnisse für die Fipronil-Behandlungen. Die Larven in den MA-K-Fipronil-Kombinationen und in den Fipronil-Ansätzen starben circa acht Tage nach ihrem Schlupf.

Tab. 21: U- und p-Werte des U-Tests nach Mann und Whitney zur Schlupfrate der Larven und die Chancenverhältnisse (CV) der Behandlungen zu den Kontrollen. Behandelt wurden die Eier von *R. microplus* mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-K bzw. mit $1,0 \times 10^2$ oder $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml von MA-7 und mit 0,32 oder 1,6 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO ($n = 4$).

Behandlung		Kontrolle	0,05 % Tween 80			1 % DMSO		
			U-Wert	p-Wert	CV	U-Wert	p-Wert	CV
Fipronil [ppm]		0,32				8,5	0,132	1,9
		1,6				5,5	0,041	4,2
MA-K	$1,0 \times 10^5$		5,0	0,171	0,4			
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^5$ &	0,32	10,0	0,762	1,2	9,5	0,610	1,1
Fipronil [ppm]	$1,0 \times 10^5$ &	1,6	0,0	0,010	16,7	4,0	0,114	15,3
	$1,0 \times 10^6$		8,0	0,476	1,6			
	$1,0 \times 10^6$ &	0,32	3,0	0,067	5,9	3,5	0,067	5,4
	$1,0 \times 10^6$ &	1,6	7,0	0,352	2,6	7,0	0,352	2,4
MA-7	$1,0 \times 10^2$		5,0	0,171	0,4			
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^2$ &	0,32	10,0	0,762	0,8	12,0	1,000	0,7
Fipronil [ppm]	$1,0 \times 10^2$ &	1,6	4,0	0,114	2,8	4,0	0,114	2,6
	$1,0 \times 10^3$		10,0	0,762	1,3			
	$1,0 \times 10^3$ &	0,32	4,0	0,114	4,1	4,0	0,114	3,8
	$1,0 \times 10^3$ &	1,6	5,0	0,171	4,3	6,5	0,257	3,9

4.3.3.2.1.2 MA-7 und Fipronil

Myzelauswuchs konnte 25 Tage nach der Behandlung mit $1,0 \times 10^2$ Konidien/ml MA-7 allein beobachtet werden, nicht aber in den Behandlungen mit den Kombinationen. In Behandlung mit der höheren MA-7-Konzentration konnte 28 Tage später in allen Varianten zum Teil

Pilzauswuchs festgestellt werden. Die Geschwindigkeit des Pilzauswuchses war in den Varianten mit MA-7 nicht signifikant unterschiedlich ($U \geq 0,0$ $p \geq 0,2$).

Weder der Zeitpunkt des Schlupfbeginns noch die Schlupfdauer wurde im Vergleich zu den Kontrollen signifikant von einer der gewählten MA-7- bzw. Fipronil-Konzentrationen allein oder in Kombination beeinflusst ($U \geq 3,0$, $p \geq 0,2$) (Tab. 20).

Keine der Behandlungen mit $1,0 \times 10^2$ oder $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-7 allein oder in Kombination mit 0,32 oder 1,6 ppm Fipronil verursachten eine geringere Schlupfrate als die Tween- oder DMSO-Kontrolle ($U \geq 4,0$, $p \geq 0,11$). Einzig das Chancenverhältnis der Kombination aus $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-7 und 0,32 ppm war sowohl höher als das von $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-7 als auch höher als das der Fipronil-Behandlung (Tab. 21). Die Larven in den MA-7-Fipronil-Kombinationen und in den Fipronil-Ansätzen starben circa acht Tage nach ihrem Schlupf.

Die Schlupfraten der MA-7- und MA-K-Behandlungen allein oder in Kombination mit 0,32 ppm Fipronil waren nicht unterschiedlich ($U \geq 5,5$, $p \geq 0,5$). Es schlüpften aber signifikant weniger Larven aus Eiern, die mit der Kombination aus $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml MA-K und 1,6 ppm Fipronil behandelt wurden als aus Eiern, die mit $1,0 \times 10^2$ Konidien/ml MA-7 und 1,6 ppm behandelt wurden ($U = 0$, $p = 0,029$).

4.3.3.2.2 *M. anisopliae* und Amitraz

4.3.3.2.2.1 MA-K und Amitraz

In den Kombinationen aus MA-K mit Amitraz konnte in einem Teil der Ansätze nach 14 bis 21 Tagen ein Myzelauswuchs beobachtet werden. Zwischen der Geschwindigkeit des MA-K Auswuchses der einzelnen Varianten gab es keine Unterschiede ($U \geq 0,5$, $p \geq 0,67$).

Keine Behandlung mit MA-K (allein oder in Kombination) hatte einen Einfluss auf den Zeitpunkt des Schlupfbeginns oder auf die Schlupfdauer ($U \geq 5,0$, $p \geq 0,17$) (Tab. 22).

Es schlüpften $66,8 \pm 21,70$ % bzw. $64,8 \pm 33,34$ % der Larven aus den Eiern, die mit 0,05 % Tween80 bzw. 1 % DMSO behandelt worden waren. Die Schlupfraten der Larven aus Eiern, die mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K allein oder in Kombination mit 0,0128 oder 0,064 ppm Amitraz behandelt wurden, unterschieden sich nicht von den Schlupfraten in der Tween- oder DMSO-Kontrolle ($U \geq 4,0$, $p \geq 0,11$) (Abb. 56). Die Chancenverhältnisse waren nur für die Kombinationen mit $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K höher als die von MA-K und Amitraz allein. Alle anderen Chancenverhältnisse der Kombinationen waren zu den Chancenverhältnissen der MA-K- bzw. Amitraz-Behandlungen ähnlich (Tab. 23).

Tab. 22: Beginn ($\bar{x} \pm s$) des Larvenschlupfs von *R. microplus* in Tagen nach der Behandlung [TnB] und die Schlupfdauer ($\bar{x} \pm s$) in Tagen [T]. Behandelt wurden die Eier mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-K bzw. mit $1,0 \times 10^2$ oder $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml von MA-7 und mit 0,0128 oder 0,064 ppm Amitraz allein und in Kombination. Als Kontrollsubstanzen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (U-Test nach Mann und Whitney) (n = 4).

Behandlung	Schlupf		
	Beginn [TnB]	Dauer [T]	
Kontrolle	0,05 % Tween80	27,2 ± 2,79 a	8,3 ± 2,07 a
	1 % DMSO	27,6 ± 2,88 ab	8,6 ± 2,19 a
Amitraz [ppm]	0,0128	27,2 ± 2,79 a	8,8 ± 2,04 a
	0,064	27,8 ± 3,43 ab	7,7 ± 1,63 a
MA-K	$1,0 \times 10^5$	31,0 ± 4,24 ab	7,8 ± 2,87 a
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^5$ & 0,0128	29,3 ± 3,40 ab	8,0 ± 2,00 a
Amitraz [ppm]	$1,0 \times 10^5$ & 0,064	29,3 ± 3,40 ab	8,8 ± 2,06 a
	$1,0 \times 10^6$	28,3 ± 5,19 ab	10,5 ± 2,89 a
	$1,0 \times 10^6$ & 0,0128	27,3 ± 4,57 ab	10,8 ± 2,87 a
	$1,0 \times 10^6$ & 0,064	29,0 ± 2,00 ab	9,0 ± 4,40 a
MA-7	$1,0 \times 10^2$	31,0 ± 4,24 ab	6,3 ± 1,50 a
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^2$ & 0,0128	31,8 ± 4,72 ab	6,3 ± 1,50 a
Amitraz [ppm]	$1,0 \times 10^2$ & 0,064	29,3 ± 3,40 ab	9,5 ± 3,32 a
	$1,0 \times 10^3$	31,0 ± 4,24 ab	7,8 ± 2,87 a
	$1,0 \times 10^3$ & 0,0128	32,5 ± 3,32 b	5,5 ± 3,00 a
	$1,0 \times 10^3$ & 0,064	30,0 ± 2,31 ab	9,5 ± 4,12 a

4.3.3.2.2 MA-7 und Amitraz

Bei Behandlung mit $1,0 \times 10^2$ Konidien/ml MA-7 und Amitraz konnte kein Pilzauswuchs festgestellt werden. In der höheren MA-7-Konzentration ($1,0 \times 10^3$ Konidien/ml) in Kombination mit 0,0128 ppm wuchs nach 28 Tagen Myzel aus. Zwischen der Geschwindigkeit des MA-7 Auswuchses der einzelnen Varianten gab es keine Unterschiede ($U \geq 0,5$, $p \geq 0,67$).

Der Schlupfbeginn verzögerte sich in der Behandlung mit $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-7 und 0,0128 ppm im Vergleich zu dem in den Behandlungen mit 0,05 % Tween80, 1 % DMSO und Amitraz zumindest tendenziell ($U \leq 2,5$, $p \leq 0,063$). Keine andere Behandlung mit MA-7 hatte einen Einfluss auf den Zeitpunkt des Schlupfbeginns oder auf die Schlupfdauer ($U \geq 4,0$, $p \geq 0,11$) (Tab. 22).

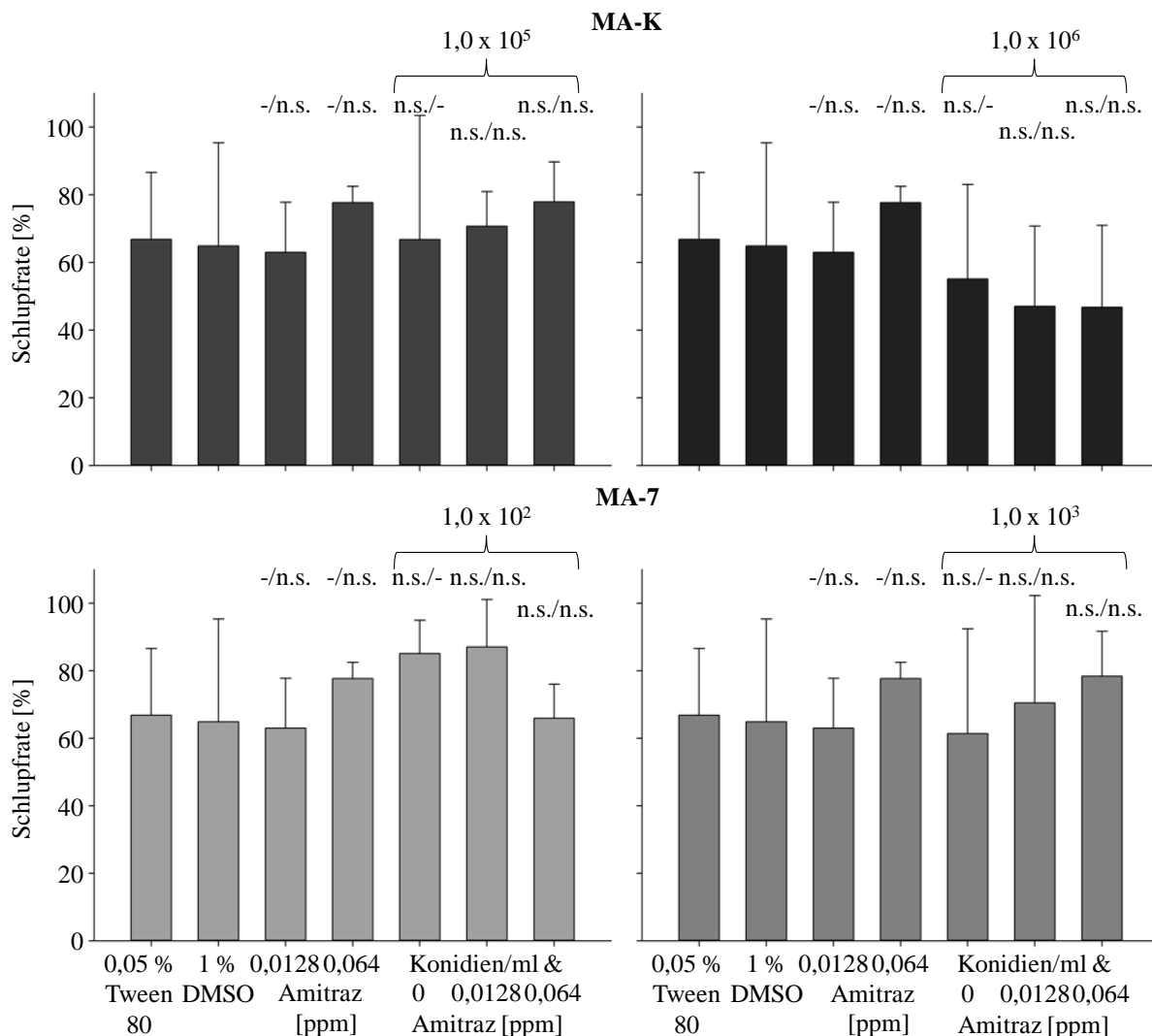


Abb. 56: Schlupfrate ($\bar{x} \pm s$) der Larven von *R. microplus* nach 42 Tagen. Behandelt wurden die Eier mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-K bzw. mit $1,0 \times 10^2$ oder $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml von MA-7 und mit 0,0128 oder 0,064 ppm Amitraz allein und in Kombination. Als Kontrollsubstanzen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen über den Balken zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO an (Log-Rang-Test). Sternchen zwischen den Abbildungen zeigen Unterschiede zwischen MA-K und MA-7 an (U-Test nach Mann und Whitney) ($n = 4$).

Die Schlupfraten der Larven aus Eiern, die mit $1,0 \times 10^2$ oder $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-7 allein oder in Kombination mit 0,0128 oder 0,064 ppm Amitraz behandelt wurden, unterschieden sich nicht von den Schlupfraten in der Tween- oder DMSO-Kontrolle ($U \geq 4,0$, $p \geq 0,11$) (Abb. 56). Auch die Chancenverhältnisse der Kombinationen unterschieden sich nicht von denen der MA-7- bzw. Amitraz-Behandlung (Tab. 23).

Es gab weder allein noch in Kombination mit Amitraz Unterschiede in den Schlupfraten der MA-7- und MA-K-Behandlungen ($U \geq 3,0$, $p \geq 0,2$).

Tab. 23: U- und p-Werte des U-Tests nach Mann und Whitney zur Schlupfrate der Larven von *R. microplus* sowie die Chancenverhältnisse (CV) der Behandlungen zu den Kontrollen. Behandelt wurden die Eier mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-K bzw. mit $1,0 \times 10^2$ oder $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml von MA-7 und mit 0,0128 oder 0,064 ppm Amitraz allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO (n = 4).

Behandlung		Kontrolle	0,05 % Tween80			1 % DMSO		
			U-Wert	p-Wert	CV	U-Wert	p-Wert	CV
Amitraz [ppm]		0,0128				12,00	0,394	1,1
		0,064				14,00	0,589	0,5
MA-K	$1,0 \times 10^5$		5,0	0,171	0,4			
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^5$ & 0,0128		11,0	0,914	0,8	11,50	0,914	0,8
Amitraz [ppm]	$1,0 \times 10^5$ & 0,064		12,0	1,000	0,6	10,00	0,762	0,5
	$1,0 \times 10^6$		8,0	0,476	1,6			
	$1,0 \times 10^6$ & 0,0128		5,0	0,171	2,3	6,00	0,257	2,1
	$1,0 \times 10^6$ & 0,064		6,0	0,257	2,3	4,00	0,114	2,1
MA-7	$1,0 \times 10^2$		5,0	0,171	0,4			
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^2$ & 0,0128		4,0	0,114	0,3	6,00	0,257	0,3
Amitraz [ppm]	$1,0 \times 10^2$ & 0,064		11,0	0,914	1,0	9,00	0,610	1,0
	$1,0 \times 10^3$		10,0	0,762	1,3			
	$1,0 \times 10^3$ & 0,0128		7,0	0,352	0,8	8,00	0,476	0,8
	$1,0 \times 10^3$ & 0,064		6,0	0,257	0,6	9,00	0,610	0,5

4.3.3.2.3 *M. anisopliae* und Permethrin

4.3.3.2.3.1 MA-K und Permethrin

Es konnte in den Kombinationsbehandlungen mit Permethrin und MA-K nach $23 \pm 7,07$ Tagen (50 % der Ansätze von $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml) bzw. 18 Tagen (25 % der Ansätze der Kombination mit $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml) Myzelauswuchs gefunden werden. Bei Eiern, die nur mit MA-K behandelt wurden, wuchs nach 14 Tagen Pilzmyzel aus. Zwischen der Geschwindigkeit des MA-K-Auswuchses der einzelnen Varianten gab es aber keine Unterschiede ($U \geq 0$, $p \geq 0,33$).

Der Beginn des Larvenschlupfs lag im Mittel in der Kontrolle bei $27,2 \pm 2,79$ (0,05 % Tween80) bzw. $27,6 \pm 2,88$ Tage (1 % DMSO) und dauerte $8,3 \pm 2,07$ bzw. $8,6 \pm 2,19$ Tage. Weder der Schlupfbeginn noch die Schlupfdauer wurden durch irgendeine der getesteten Varianten (MA-K allein oder in Kombination) signifikant verzögert bzw. verlängert ($U \geq 2,5$, $p \geq 0,11$) (Tab. 24).

Tab. 24: Beginn ($\bar{x} \pm s$) des Larvenschlupfs von *R. microplus* in Tagen nach der Behandlung [TnB] und die Schlupfdauer ($\bar{x} \pm s$) in Tagen [T]. Behandelt wurden die Eier mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-K bzw. mit $1,0 \times 10^2$ oder $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml von MA-7 und mit 40 ppm Permethrin allein und in Kombination. Als Kontrollsubstanzen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede (U-Test nach Mann und Whitney) (n = 4).

Behandlung		Schlupf	
		Beginn [TnB]	Dauer [T]
Kontrolle	0,05 % Tween80	27,2 ± 2,79 a	8,3 ± 2,07 a
	1 % DMSO	27,6 ± 2,88 a	8,6 ± 2,19 a
Permethrin [ppm]	40	27,8 ± 3,43 a	8,2 ± 1,83 a
MA-K [Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^5$	31,0 ± 4,24 a	7,8 ± 2,87 a
Permethrin [ppm]	$1,0 \times 10^5$ & 40	27,3 ± 4,57 a	10,0 ± 2,00 a
	$1,0 \times 10^6$	28,3 ± 5,19 a	10,5 ± 2,89 a
	$1,0 \times 10^6$ & 40	27,3 ± 4,57 a	10,8 ± 2,87 a
MA-7 [Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^2$	31,0 ± 4,24 a	6,3 ± 1,50 a
	Permethrin [ppm]	$1,0 \times 10^2$ & 40	30,0 ± 2,31 a
$1,0 \times 10^3$		31,0 ± 4,24 a	7,8 ± 2,87 a
$1,0 \times 10^3$ & 40		29,3 ± 3,40 a	9,5 ± 1,73 a

Es schlüpften $66,8 \pm 21,70$ % bzw. $64,8 \pm 33,34$ % der Larven aus den Eiern, die mit 0,05 % Tween80 bzw. 1 % DMSO behandelt worden waren. Die Schlupfraten der Eier, die mit MA-K allein behandelt wurden, wurden im Vergleich zur Tween-Kontrolle nicht beeinträchtigt ($U \geq 5,0$, $p \geq 0,17$) (Abb. 57). Auch die Schlupfrate der Larven aus Eiern, die mit 40 ppm Permethrin behandelt wurden, unterschied sich nicht von der Schlupfrate in der DMSO-Behandlung ($U = 14,5$, $p = 0,6$). Die Schlupfraten der Larven aus Eiern, die mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K allein oder in Kombination mit 40 ppm Permethrin behandelt wurden, unterschieden sich weder von der in der Tween- noch von der in der DMSO-Kontrolle ($U \geq 5,0$, $p \geq 0,17$). Das Chancenverhältnis der Kombination aus $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml MA-K und 40 ppm Permethrin war leicht höher als das von MA-K und Permethrin (Tab. 25). Die Kombination mit $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml hatte ein leicht geringeres Chancenverhältnis als MA-K allein, aber ein leicht höheres als Permethrin allein. Larvenmortalität wurde 7 bis 14 Tage nach dem Schlupf in jeweils 25 % der Kombinationsansätze festgestellt.

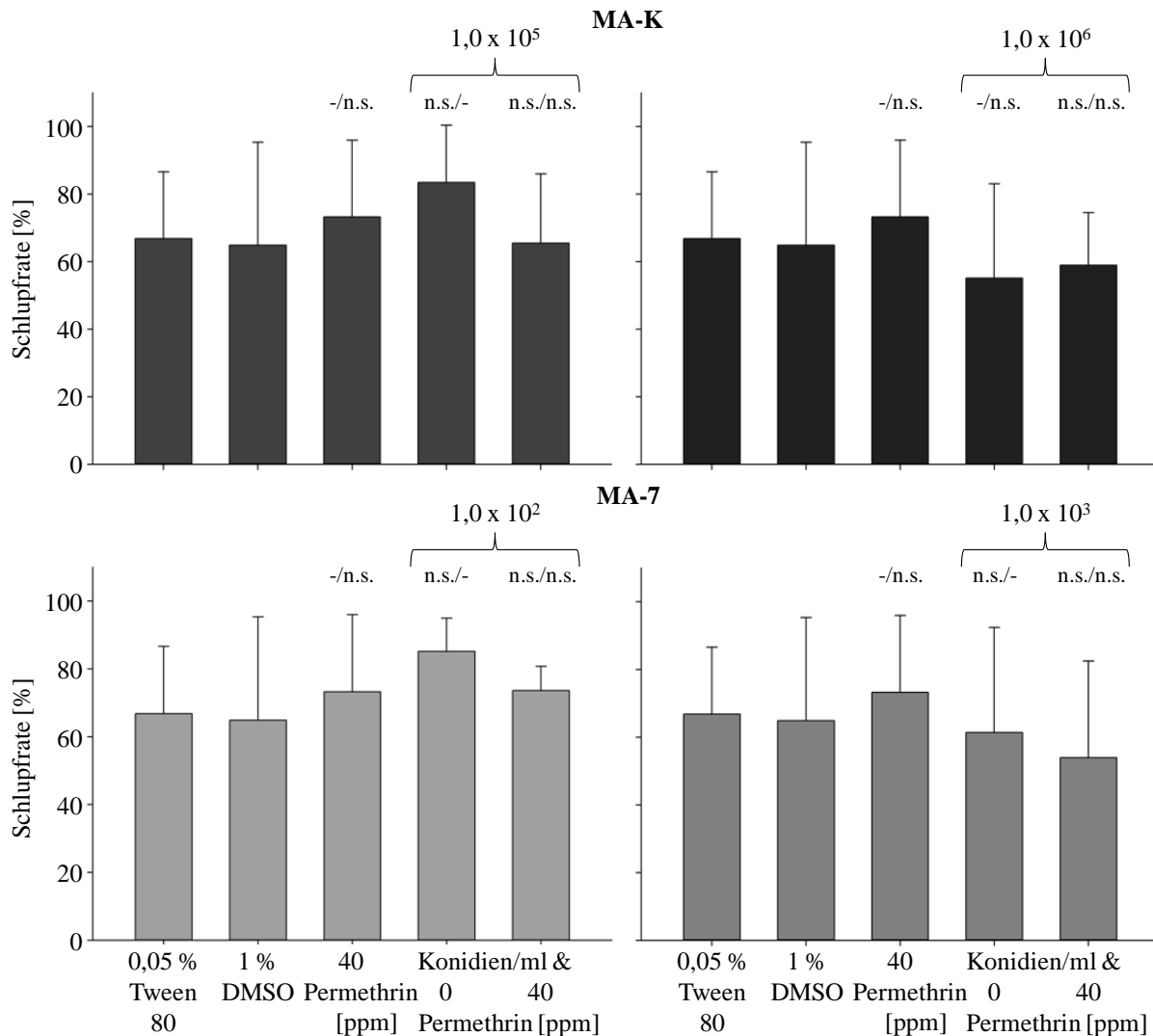


Abb. 57: Schlupfrate ($\bar{x} \pm s$) der Larven von *R. microplus* nach 42 Tagen. Behandelt wurden die Eier mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-K bzw. mit $1,0 \times 10^2$ oder $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml von MA-7 und mit 40 ppm Permethrin allein und in Kombination. Als Kontrollsubstanzen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen über den Balken zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO an (Log-Rang-Test).

4.3.3.2.3.2 MA-7 und Permethrin

Myzelauswuchs konnte nur 25 Tage nach der Behandlung mit $1,0 \times 10^2$ Konidien/ml MA-7 allein beobachtet werden, nicht aber in den Kombinationen. In den Behandlungen mit $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-7-Konzentration konnte in allen Varianten 28 Tage später zum Teil Pilzauswuchs festgestellt werden. Zwischen der Geschwindigkeit des MA-7-Auswuchses der einzelnen Varianten gab es aber keine Unterschiede ($U \geq 0,0$ $p \geq 0,33$).

Keine der Behandlungen mit MA-7 (allein oder in Kombination) hatte einen Einfluss auf den Schlupfbeginn oder die Schlupfdauer ($U \geq 5,5$, $p \geq 0,17$) (Tab. 24).

Tab. 25: U- und p-Werte des U-Tests nach Mann und Whitney zur Schlupfrate der Larven von *R. microplus* und die Chancenverhältnisse (CV) der Behandlungen zu den Kontrollen. Behandelt wurden die Eier mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-K bzw. mit $1,0 \times 10^2$ oder $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml von MA-7 und mit 40 ppm Permethrin allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO (n = 4).

Behandlung	Kontrolle	0,05 % Tween80			1 % DMSO		
		U-Wert	p-Wert	CV	U-Wert	p-Wert	CV
Permethrin [ppm]	40				14,5	0,589	0,7
MA-K	$1,0 \times 10^5$	5,0	0,171	0,4			
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^5$ & 40	11,0	0,914	1,1	10,5	0,762	1,0
Permethrin [ppm]	$1,0 \times 10^6$	8,0	0,476	1,6			
	$1,0 \times 10^6$ & 40	10,0	0,762	1,4	7,0	0,352	1,3
MA-7	$1,0 \times 10^2$	5,0	0,171	0,4			
[Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^2$ & 40	11,0	0,914	0,7	11,0	0,914	0,7
Permethrin [ppm]	$1,0 \times 10^3$	10,0	0,762	1,3			
	$1,0 \times 10^3$ & 40	6,0	0,257	1,7	8,0	0,476	1,6

Die Schlupfraten in den Behandlungen mit $1,0 \times 10^2$ oder $1,0 \times 10^3$ Konidien/ml MA-7 allein oder in Kombination mit 40 ppm Permethrin hatten keinen Einfluss auf die Schlupfrate im Vergleich zur Kontrolle ($U \geq 5,0$, $p \geq 0,17$) (Abb. 57). Die Chancenverhältnisse der Kombinationen waren gleich oder leicht höher als die von MA-7 oder Permethrin allein (Tab. 25). Eine Larvenmortalität wurde 7 bis 14 Tage nach dem Schlupf in jeweils 25 % der Kombinationsansätze festgestellt.

Es gab keine Unterschiede in der Schlupfrate der MA-7 und MA-K-Behandlungen allein oder in Kombination mit Permethrin ($U \geq 6,0$, $p \geq 0,7$).

4.3.3.3 Ungesogene Larven

Die Kombinationsversuche wurden für alle Schädlingsbekämpfungsmittel parallel durchgeführt, so dass die Kontroll- und MA-K-/MA-7-Mortalitäten für alle Schädlingsbekämpfungsmittelansätze identisch waren. Es waren 42 Tage nach der Behandlung mit 0,05 % Tween80 $16,4 \pm 21,18$ % der ungesogenen Larven gestorben. Bei Behandlung der Larven mit 1 % DMSO starben $26,8 \pm 27,62$ %. Die Mortalität, die von MA-K allein verursacht wurde, lag bei $22,1 \pm 38,45$ %. Weder die Behandlung mit $1,0 \times 10^5$ noch mit $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K bewirkte eine erhöhte Mortalität im Vergleich zur Behandlung mit 0,05 % Tween80 ($U \geq 11,0$, $p \geq 0,31$). Die Mortalität in der Behandlung mit MA-7 allein lag in beiden

Konzentrationen im Durchschnitt unter 10 % und wies keine Unterschiede zu der Mortalität in der Tween-Behandlung auf ($U \geq 9,5$, $p \geq 0,18$). Zwischen den Mortalitäten, die von den beiden Pilzstämmen allein verursacht wurden, gab es keine Unterschiede ($U \geq 9,0$, $p \geq 0,18$).

4.3.3.3.1 *M. anisopliae* und Fipronil

4.3.3.3.1.1 MA-K und Fipronil

Bei Behandlung mit 0,0128 ppm bzw. 0,064 ppm Fipronil allein starben $6,4 \pm 4,60$ % bzw. $37,5 \pm 19,56$ % der Larven (Abb. 58). Die Mortalität in den Fipronil-Behandlungen und der DMSO-Kontrolle war nicht unterschiedlich ($U \geq 8,0$, $p \geq 0,1$) (Tab. 26). Die Kombination von $1,0 \times 10^5$ bzw. $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K mit 0,0128 ppm bewirkte keine Unterschiede in der Mortalität im Vergleich mit der Tween- oder DMSO-Kontrolle ($U \geq 11,0$, $p \geq 0,3$).

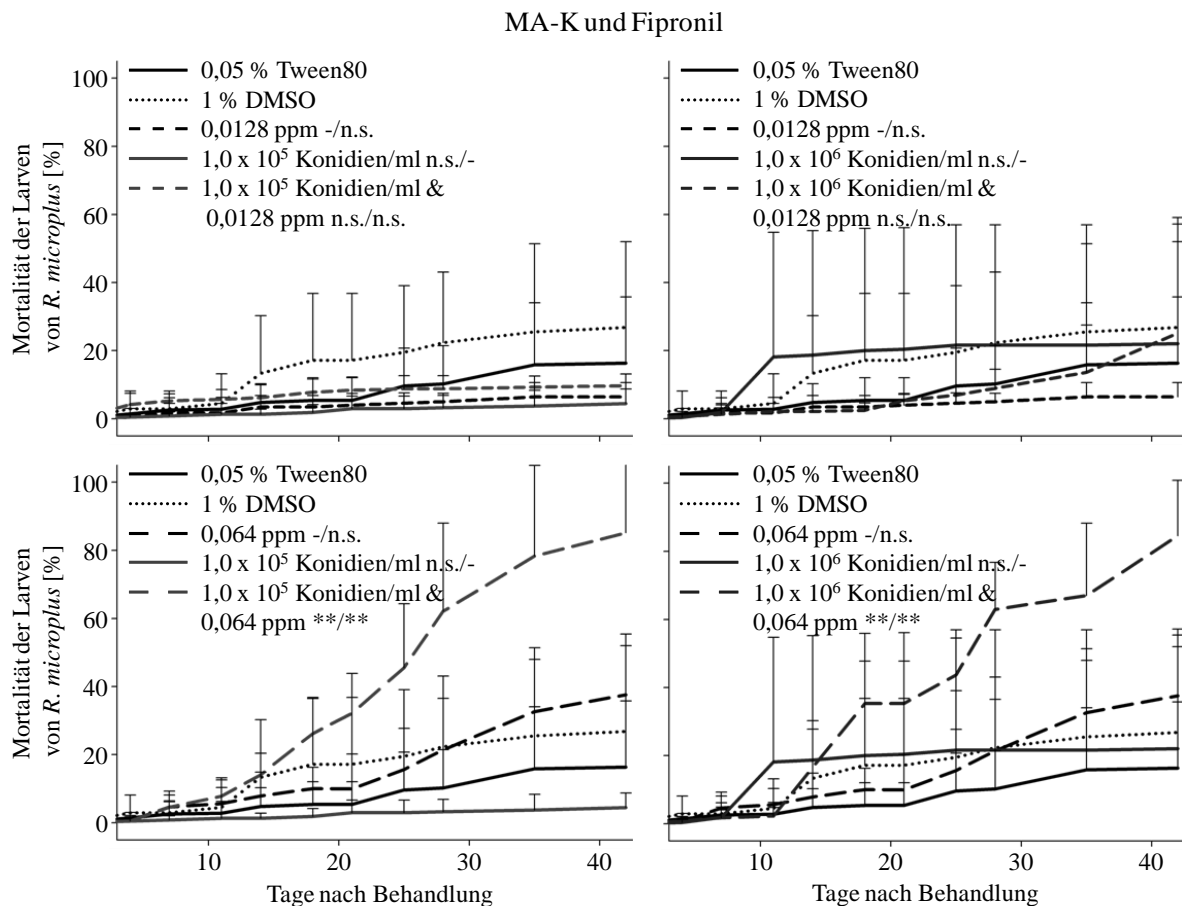


Abb. 58: Mortalität ($\bar{x} \pm s$) der ungesogenen Larven von *R. microplus* über den Versuchszeitraum von 42 Tagen. Behandelt wurden die Larven mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-K und mit 0,0128 ppm oder 0,064 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO (U-Test nach Mann und Whitney) ($n = 6$).

Tab. 26: U- und p-Werte des U-Tests nach Mann und Whitney zur Mortalität der ungesogenen Larven von *R. microplus* und die Chancenverhältnisse (CV) der Behandlungen zu den Kontrollen. Behandelt wurden die Larven mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-K bzw. MA-7 und mit 0,0128 oder 0,064 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Zusätzlich wurden für Behandlungen, die signifikant unterschiedlich zur Kontrolle waren, eine erwartete Mortalität (M_E) und ein χ^2 -Wert ($\chi^2_{(E)}$) berechnet, um den auftretenden Effekt für die signifikanten Interaktionen in den Kombinationsvarianten zu bestimmen (n = 6).

Behandlung	Kontrolle	0,05 % Tween80			1 % DMSO			M_E	$\chi^2_{(E)}$	Effekt
		U-Wert	p-Wert	CV	U-Wert	p-Wert	CV			
Fipronil [ppm]	0,0128				8,0	0,132	0,2			
	0,064				13,0	0,485	1,6			
MA-K [Konidien/ml] & Fipronil [ppm]	$1,0 \times 10^5$	11,0	0,310	0,2						
	$1,0 \times 10^5$ & 0,0128	17,0	0,937	0,5	11,0	0,310	0,3			
	$1,0 \times 10^5$ & 0,064	1,0	0,004	29,2	2,0	0,009	15,6	40,3	49,8	synergistisch
	$1,0 \times 10^6$	18,0	1,000	1,4						
	$1,0 \times 10^6$ & 0,0128	13,5	0,485	1,7	16,0	0,818	0,9			
	$1,0 \times 10^6$ & 0,064	1,0	0,004	27,9	1,0	0,004	15,0	51,3	21,6	synergistisch
MA-7 [Konidien/ml] & Fipronil [ppm]	$1,0 \times 10^5$	15,0	0,699	0,5						
	$1,0 \times 10^5$ & 0,0128	14,5	0,589	0,5	11,0	0,310	0,3			
	$1,0 \times 10^5$ & 0,064	6,0	0,065	5,7	10,0	0,240	3,1			
	$1,0 \times 10^6$	9,5	0,180	0,2						
	$1,0 \times 10^6$ & 0,0128	17,0	0,937	1,5	14,0	0,589	0,8			
	$1,0 \times 10^6$ & 0,064	3,0	0,015	6,3	6,5	0,065	3,4			

Die niedrigen Chancenverhältnisse der Kombinationen von MA-K und 0,0128 ppm bedeuten, dass eine Mortalität in der Kombination ähnlich wahrscheinlich ist wie in der MA-K-Behandlung bzw. dass sie in der Tween-Behandlung wahrscheinlicher ist. Die Kombinationen ($1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml) mit der höheren Fipronil-Konzentration (0,064 ppm) verursachten aber höhere Mortalitäten als Tween oder DMSO ($U \leq 2,0$, $p \leq 0,009$) (Abb. 58). Die Chancenverhältnisse der Kombinationen waren deutlich höher als die der MA-K- oder Fipronil-Behandlungen, so dass für beide Kombinationen eine Mortalität wahrscheinlicher war als in der MA-K- oder Fipronil-Behandlung (Tab. 26). Die Interaktion von $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K und 0,064 ppm Fipronil war synergistisch.

4.3.3.3.1.2 MA-7 und Fipronil

Die Kombination beider MA-7-Konzentrationen mit 0,0128 ppm Fipronil erhöhte die

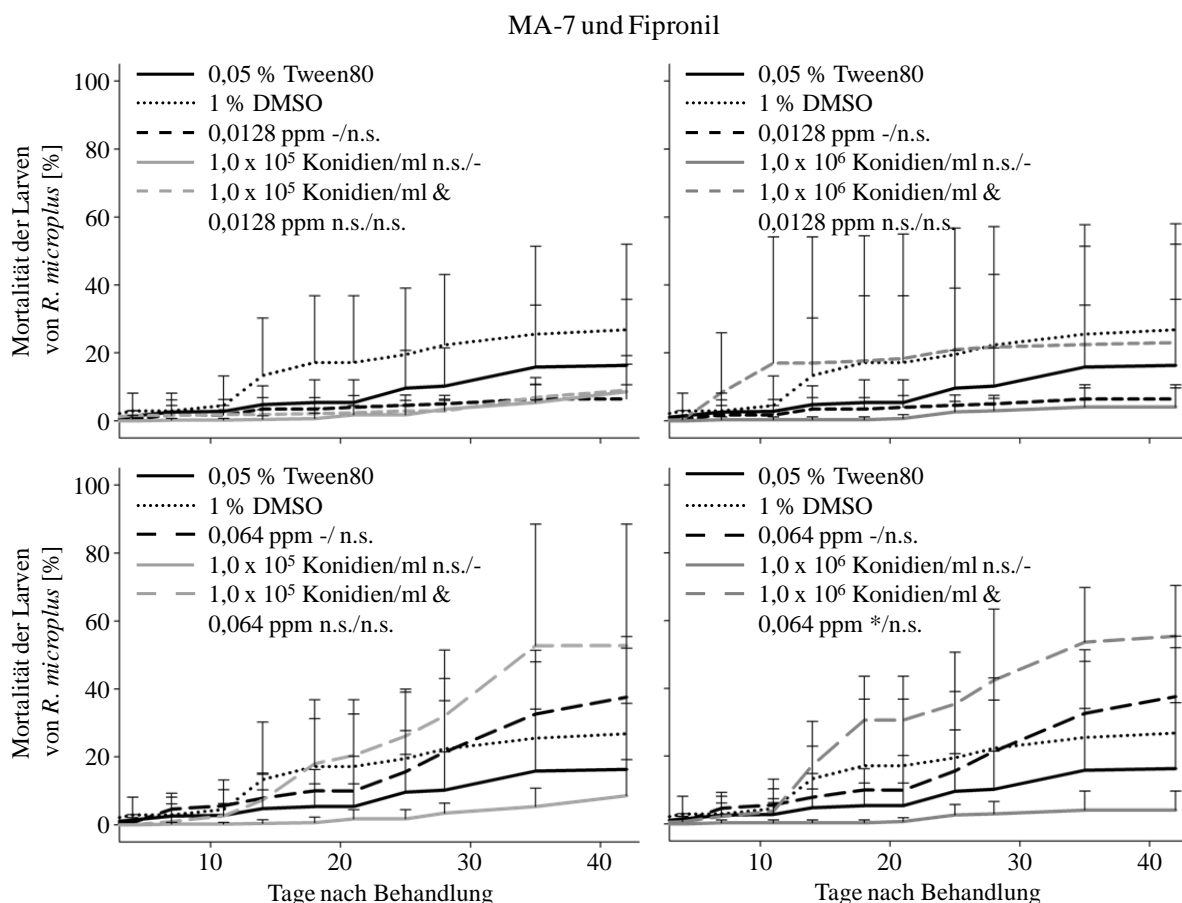


Abb. 59: Mortalität ($\bar{x} \pm s$) der ungesogenen Larven von *R. microplus* über den Versuchszeitraum von 42 Tagen. Behandelt wurden die Larven mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-7 und mit 0,0128 ppm oder 0,064 ppm Fipronil allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO (U-Test nach Mann und Whitney) ($n = 6$).

Mortalität im Vergleich zur Tween- und DMSO-Kontrolle nicht ($U \geq 11,0$ $p \geq 0,3$) (Abb. 59). Die Chancenverhältnisse waren niedrig, so dass ein Auftreten einer Mortalität in der Kombination mit $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml und 0,0128 ppm und der MA-7 Behandlung gleich wahrscheinlich war. Das Chancenverhältnis der Kombination aus $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml und 0,0128 ppm war etwas höher als das von MA-7 oder 0,0128 ppm allein. (Tab. 26). Die Kombinationen mit der höheren Fipronil-Konzentration verursachten aber (tendenziell) höhere Mortalitäten als Tween ($U \leq 6,0$, $p \leq 0,065$) (Abb. 59). Allerdings verursachte nur die Kombination mit $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-7 eine tendenziell höhere Mortalität als DMSO ($U \leq 6,5$, $p \leq 0,065$). Die Chancenverhältnisse waren für die Kombinationen mindestens doppelt so hoch wie für die Einzelbehandlungen (Tab. 26).

Ein Vergleich der beiden Pilzstämme ergab, dass nur die Kombination aus $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-7 und 0,064 ppm Fipronil im Vergleich mit der von $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K eine geringere Mortalität verursachte ($U = 4,0$, $p = 0,026$). Alle anderen Kombinationen waren aber nicht unterschiedlich ($U \geq 11,5$, $p \geq 0,31$).

4.3.3.3.2 *M. anisopliae* und Amitraz

4.3.3.3.2.1 MA-K und Amitraz

Die Mortalität der Larven, die mit 0,0128 ppm bzw. 0,064 ppm Amitraz behandelt wurden, betrug $13,6 \pm 13,13$ % bzw. $21,7 \pm 17,76$ %. Es gab zwischen den Amitraz-Behandlungen und der DMSO-Kontrolle keine Unterschiede ($U \geq 17,5$, $p \geq 0,39$). Keine der Kombinationen von MA-K und Amitraz verursachte eine höhere Mortalität als Tween oder DMSO ($U \geq 8,0$ $p \geq 0,13$) (Abb. 60). Die Chancenverhältnisse von $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml MA-K allein und in Kombination waren kleiner 1, so dass eine Mortalität in der Kontrolle wahrscheinlicher war. Bei $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K in Kombination mit 0,0128 ppm Amitraz waren die Chancenverhältnisse leicht höher als die in den Einzelbehandlungen, während das Chancenverhältnis der Kombination aus $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml mit der höheren Amitraz-Konzentration deutlich kleiner 1 war (Tab. 27).

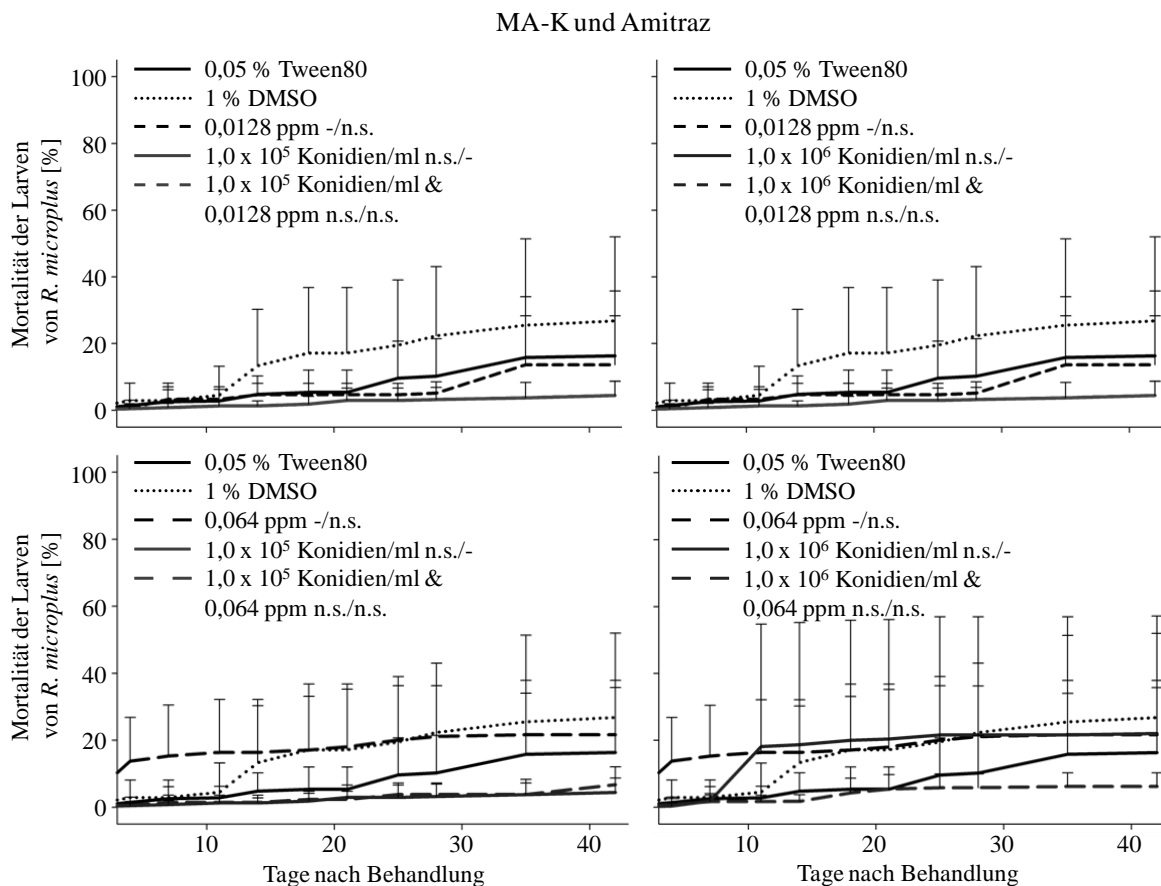


Abb. 60: Mortalität ($\bar{x} \pm s$) der ungesogenen Larven von *R. microplus* über den Versuchszeitraum von 42 Tagen. Behandelt wurden die Larven mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-K und mit 0,0128 ppm oder 0,064 ppm Amitraz allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO (U-Test nach Mann und Whitney) an (n=6).

4.3.3.3.2.2 MA-7 und Amitraz

Auch keine der Kombinationen aus MA-7 und Amitraz konnte die Mortalität im Vergleich mit Tween und DMSO erhöhen ($U \geq 8,0$, $p \geq 0,13$) (Abb. 61). Die Chancenverhältnisse von $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml MA-7 allein oder in Kombination wurden mit zunehmender Amitraz-Konzentration zwar größer, kamen aber selbst in der Kombination von $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml und 0,064 ppm nicht über den Wert 1 hinaus. Ähnlich verhielt es sich für die Behandlungen mit $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml. Allerdings war das Chancenverhältnis der Kombination aus $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml mit 0,0128 ppm Amitraz größer als 1 (CV = 1,3) (Tab. 27).

Zwischen MA-K und MA-7 gab es keine Unterschiede hinsichtlich der Mortalität ($U \geq 11,5$, $p \geq 0,31$).

Tab. 27: U- und p-Werte des U-Tests nach Mann und Whitney zur Mortalität der ungesogenen Larven von *R. microplus* und die Chancenverhältnisse (CV) der Behandlungen zu den Kontrollen. Behandelt wurden die Larven mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-K bzw. MA-7 und mit 0,0128 oder 0,064 ppm Amitraz allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO (n = 6).

Behandlung	Kontrolle	0,05 % Tween80			1 % DMSO		
		U-Wert	p-Wert	CV	U-Wert	p-Wert	CV
Amitraz [ppm]	0,0128				12,0	0,394	0,4
	0,064				17,5	0,937	0,8
MA-K [Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^5$	11,0	0,310	0,2			
Amitraz [ppm]	$1,0 \times 10^5$ & 0,0128	14,5	0,589	0,4	8,0	0,132	0,2
	$1,0 \times 10^5$ & 0,064	18,0	1,000	0,8	10,5	0,240	0,4
	$1,0 \times 10^6$	18,0	1,000	1,4			
	$1,0 \times 10^6$ & 0,0128	16,5	0,818	2,9	16,0	0,818	1,5
	$1,0 \times 10^6$ & 0,064	13,5	0,485	0,3	8,5	0,132	0,2
MA-7 [Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^5$	15,0	0,699	0,5			
Amitraz [ppm]	$1,0 \times 10^5$ & 0,0128	16,0	0,818	0,7	12,0	0,394	0,4
	$1,0 \times 10^5$ & 0,064	16,0	0,818	1,0	15,0	0,699	0,5
	$1,0 \times 10^6$	9,5	0,180	0,2			
	$1,0 \times 10^6$ & 0,0128	15,0	0,699	1,3	11,0	0,310	0,7
	$1,0 \times 10^6$ & 0,064	14,0	0,589	0,4	8,0	0,132	0,2

MA-7 und Amitraz

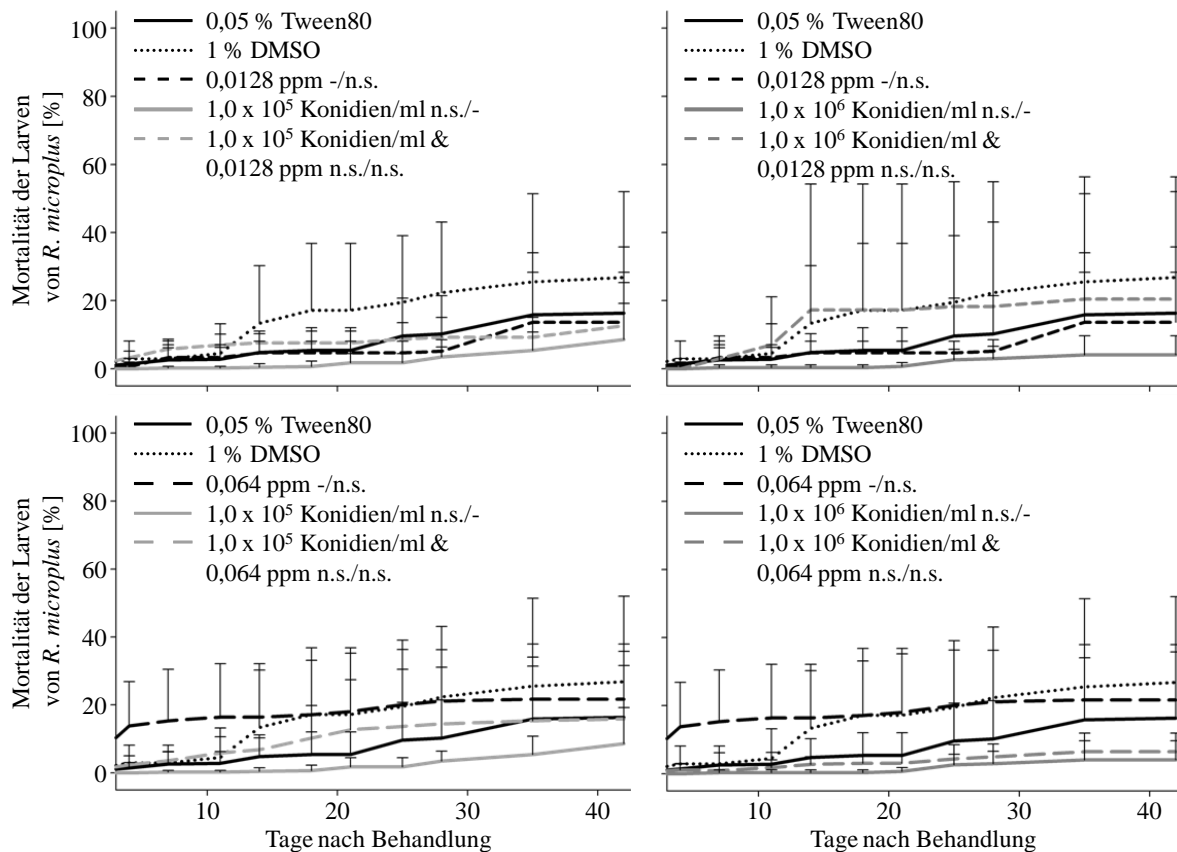


Abb. 61: Mortalität ($\bar{x} \pm s$) der ungesogenen Larven von *R. microplus* über den Versuchszeitraum von 42 Tagen. Behandelt wurden die Larven mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-7 und mit 0,0128 ppm oder 0,064 ppm Amitraz allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO (U-Test nach Mann und Whitney) ($n=6$).

4.3.3.3.3 *M. anisopliae* und Permethrin

4.3.3.3.3.1 MA-K und Permethrin

Die Mortalität der Larven, die mit 8 ppm oder 40 ppm Permethrin behandelt wurden, lag bei $10,4 \pm 9,82$ % bzw. $23,9 \pm 26,06$ % und war nicht unterschiedlich zu der DMSO-Kontrolle ($U \geq 11,5$, $p \geq 0,31$). Keine der Kombinationen von MA-K und Permethrin verursachten eine höhere Mortalität als die Tween-Kontrolle ($U \geq 8,5$, $p \geq 0,13$) (Abb. 62). Allerdings war die Mortalität in der Behandlung mit $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml und 40 ppm Permethrin signifikant geringer als in der DMSO-Kontrolle ($U = 4,0$, $p = 0,026$). Die Chancenverhältnisse für $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml MA-K allein oder in Kombination waren alle kleiner 1; damit ist eine Mortalität in den Kontrollen wahrscheinlicher als in der Pilzbehandlung. Die Kombinationen aus $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K und 8 bzw. 40 ppm Permethrin hatten kleinere Chancenverhältnisse als die dazugehörigen Einzelbehandlungen (Tab. 28).

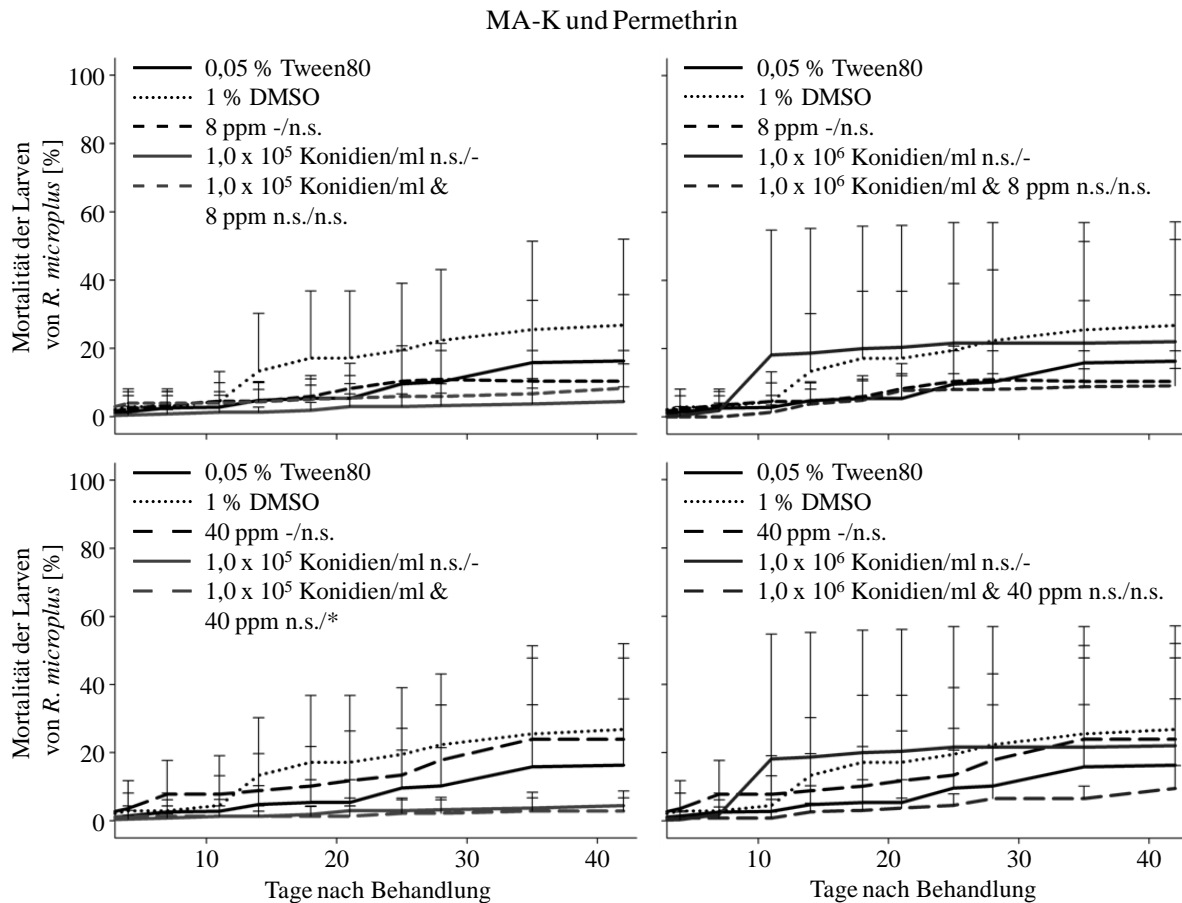


Abb. 62: Mortalität ($\bar{x} \pm s$) der ungesogenen Larven von *R. microplus* über den Versuchszeitraum von 42 Tagen. Behandelt wurden die Larven mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-K und mit 8 ppm oder 40 ppm Permethrin allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO (U-Test nach Mann und Whitney) ($n=6$).

4.3.3.3.1 MA-7 und Permethrin

Die Behandlung mit Kombinationen aus MA-7 und Permethrin erhöhten die Mortalität im Vergleich zur Tween- bzw. DMSO-Kontrolle nicht ($U \geq 9,0$, $p \geq 0,18$). In der Kombination aus $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml und 40 ppm Permethrin war der Anteil der toten Larven sogar signifikant geringer als in der DMSO-Kontrolle ($U = 5,0$, $p = 0,041$) (Abb. 63). Die Chancenverhältnisse von $1,0 \times 10^5$ und $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-7 allein und in Kombination waren bis auf zwei Ausnahmen alle kleiner 1. Damit war das Auftreten einer Larvenmortalität in den Kontrollen wahrscheinlicher als in der Pilzbehandlung (Tab. 28).

Der Vergleich der Kombinationen von MA-K und MA-7 erbrachte keine Unterschiede ($U \geq 7,0$, $p \geq 0,093$). Nur die Kombination aus $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml MA-K und 40 ppm verursachte eine geringere Mortalität als die entsprechende Kombination mit MA-7 ($U = 2,0$, $p = 0,009$).

Tab. 28: U- und p-Werte des U-Tests nach Mann und Whitney zur Mortalität der ungesogenen Larven von *R. microplus* und die Chancenverhältnisse (CV) der Behandlungen zu den Kontrollen. Behandelt wurden die Larven mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-K bzw. MA-7 und mit 8 oder 40 ppm Permethrin allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO (n = 6).

Behandlung	Kontrolle	0,05 % Tween80			1 % DMSO		
		U-Wert	p-Wert	CV	U-Wert	p-Wert	CV
Permethrin [ppm]	8				11,5	0,310	0,3
	40				16,0	0,818	0,9
MA-K [Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^5$	11,0	0,310	0,2			
Permethrin [ppm]	$1,0 \times 10^5$ & 8	15,5	0,699	0,5	10,0	0,240	0,2
	$1,0 \times 10^5$ & 40	8,5	0,132	0,2	4,0	0,026	0,1
	$1,0 \times 10^6$	18,0	1,000	1,4			
	$1,0 \times 10^6$ & 8	18,0	1,000	0,5	13,0	0,485	0,3
	$1,0 \times 10^6$ & 40	16,0	0,818	0,5	11,0	0,310	0,3
	MA-7 [Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^5$	15,0	0,699	0,5		
Permethrin [ppm]	$1,0 \times 10^5$ & 8	15,0	0,699	0,7	10,5	0,240	0,4
	$1,0 \times 10^5$ & 40	13,0	0,485	1,2	18,0	1,000	0,6
	$1,0 \times 10^6$	9,5	0,180	0,2			
	$1,0 \times 10^6$ & 8	16,5	0,818	1,0	14,5	0,589	0,5
	$1,0 \times 10^6$ & 40	9,0	0,180	0,2	5,0	0,041	0,1

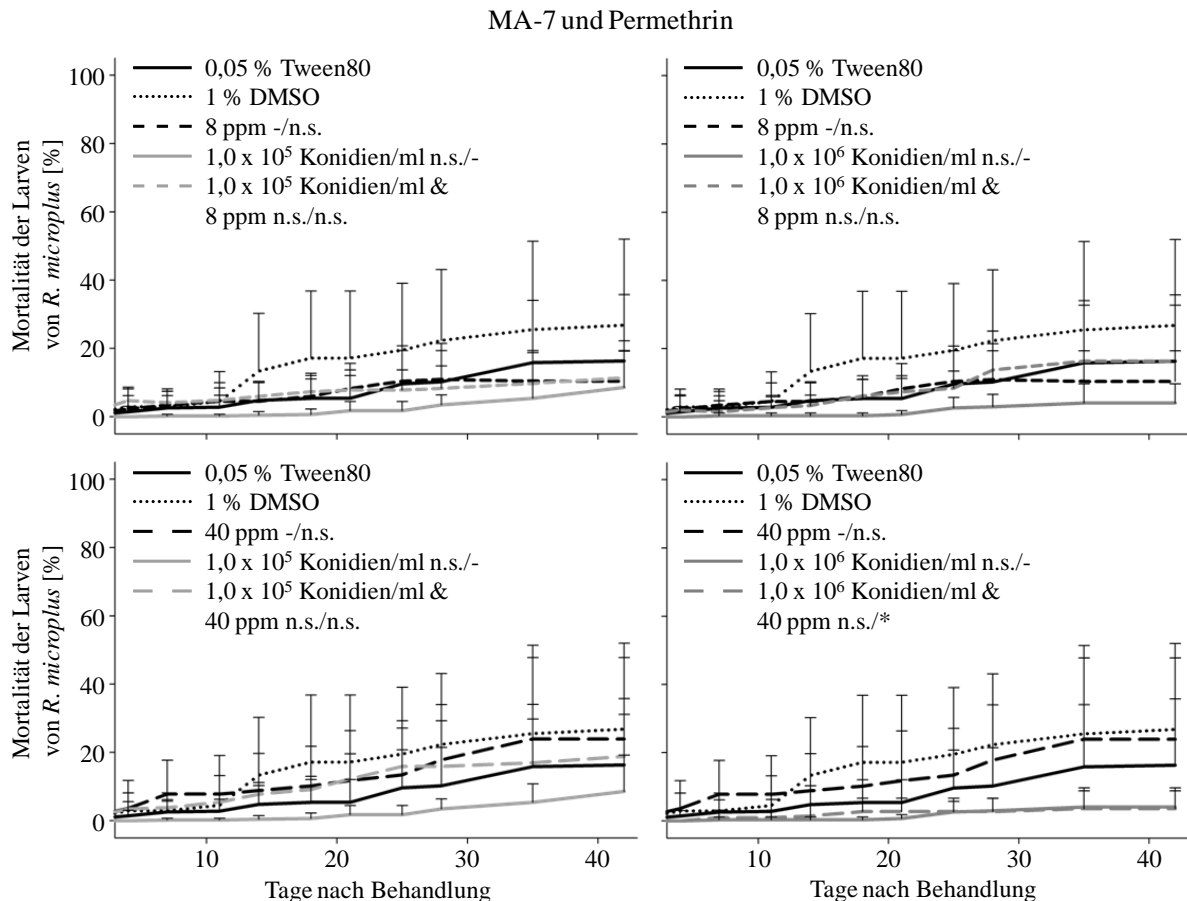


Abb. 63: Mortalität ($\bar{x} \pm s$) der ungesogenen Larven von *R. microplus* über den Versuchszeitraum von 42 Tagen. Behandelt wurden die Larven mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-7 und mit 8 ppm oder 40 ppm Permethrin allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO (U-Test nach Mann und Whitney) ($n=6$).

4.3.3.3.4 *M. anisopliae* und Imidacloprid

4.3.3.3.4.1 MA-K und Imidacloprid

Die Mortalität der Larven, die mit 40 ppm oder 200 ppm Imidacloprid behandelt wurden, lag im Durchschnitt unter 5 %. Diese Mortalitäten waren (tendenziell) geringer als die Mortalität in der DMSO-Kontrolle ($U \leq 6,0$, $p \leq 0,065$). Keine der Kombinationen von MA-K und Imidacloprid verursachte eine höhere Mortalität als Tween ($U \geq 9,0$, $p \geq 0,18$). Allerdings war die Mortalität in der Behandlung mit $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml und 40 ppm Imidacloprid signifikant geringer als in der DMSO-Kontrolle ($U = 4,0$, $p = 0,026$) (Abb. 64). Die Chancenverhältnisse von $1,0 \times 10^5$ und $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K allein und in Kombination waren bis auf zwei Ausnahmen alle kleiner als 1 (Tab. 29).

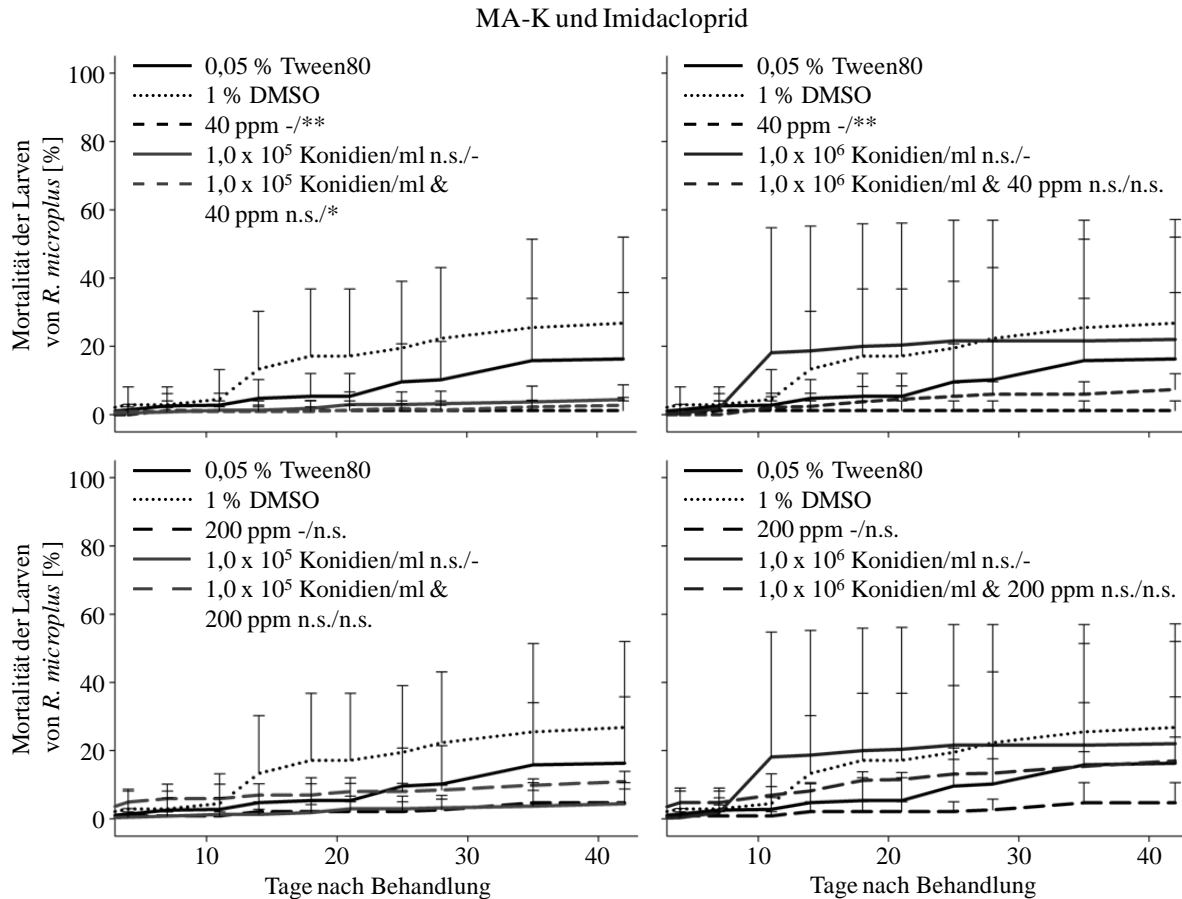


Abb. 64: Mortalität ($\bar{x} \pm s$) der ungesogenen Larven von *R. microplus* über den Versuchszeitraum von 42 Tagen. Behandelt wurden die Larven mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-K und mit 40 ppm oder 200 ppm Imidacloprid allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO (U-Test nach Mann und Whitney) ($n=6$).

4.3.3.4.2 MA-7 und Imidacloprid

Keine der Kombinationen aus MA-7 und Imidacloprid konnte die Mortalität im Vergleich zur Mortalität in der Tween- oder DMSO-Kontrolle erhöhen ($U \geq 9,0$, $p \geq 0,18$) (Abb. 65). Nur das Chancenverhältnis von $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-7 in Kombination mit 200 ppm Imidacloprid war höher als die Chancenverhältnisse von MA-7 oder 200 ppm Imidacloprid, lag aber nur bei 1,5. Alle anderen Chancenverhältnisse waren kleiner als 1 (Tab. 29).

Es gab keine Unterschiede der Mortalität in den Behandlungen mit MA-K oder MA-7 ($U \geq 4,0$, $p \geq 0,3$).

Tab. 29: U- und p-Werte des U-Tests nach Mann und Whitney zur Mortalität der ungesogenen Larven von *R. microplus* und die Chancenverhältnisse (CV) der Behandlungen zu den Kontrollen. Behandelt wurden die Larven mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-K bzw. MA-7 und mit 40 oder 200 ppm Imidacloprid allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO (n = 6).

Behandlung	Kontrolle	0,05 % Tween80			1 % DMSO		
		U-Wert	p-Wert	CV	U-Wert	p-Wert	CV
Imidacloprid [ppm]	40				2,0	0,009	0,0
	200				6,0	0,065	0,1
MA-K [Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^5$	11,0	0,310	0,2			
Imidacloprid [ppm]	$1,0 \times 10^5$ & 40	9,0	0,180	0,1	4,0	0,026	0,1
	$1,0 \times 10^5$ & 200	16,0	0,818	0,6	14,0	0,589	0,3
	$1,0 \times 10^6$	18,0	1,000	1,4			
	$1,0 \times 10^6$ & 40	14,5	0,589	0,4	10,0	0,240	0,2
	$1,0 \times 10^6$ & 200	12,5	0,394	1,0	18,0	1,000	0,6
	MA-7 [Konidien/ml] &	$1,0 \times 10^5$	15,0	0,699	0,5		
Imidacloprid [ppm]	$1,0 \times 10^5$ & 40	15,0	0,699	0,4	9,0	0,180	0,2
	$1,0 \times 10^5$ & 200	15,5	0,699	0,8	16,0	0,818	0,4
	$1,0 \times 10^6$	9,5	0,180	0,2			
	$1,0 \times 10^6$ & 40	17,5	0,937	0,6	14,0	0,589	0,3
	$1,0 \times 10^6$ & 200	11,0	0,310	1,5	16,0	0,818	0,8

4.4 Diskussion

Die südliche Rinderzecke *R. microplus* gilt als bedeutendste Nutztierzecke weltweit (Khan 2010, Nicholson *et al.* 2009). Die beträchtlichen ökonomischen Schäden durch die Übertragung von Krankheitserregern und den zum Teil erheblichen Zeckenbefall, machen Maßnahmen gegen die Zecken am Rind erforderlich (Eckert *et al.* 2008, Peter *et al.* 2005, Sonenshine 1993). Aufgrund von Resistenzentwicklungen ist es dabei erstrebenswert, die aufgewendete Ektoparasitizidmenge möglichst gering zu halten. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit Effekte der Kombinationen von *M. anisopliae* und niedrig dosierten Konzentrationen synthetischer Schädlingsbekämpfungsmittel auf verschiedene Zeckenstadien untersucht. Dazu war es zunächst notwendig, die subletalen Konzentrationen der Schädlingsbekämpfungsmittel und von MA-K und MA-7 zu ermitteln, um diese anschließend gemeinsam anzuwenden. Die Wahl der mittleren Konzentrationen von *M. anisopliae* erfolgte primär aus versuchstechnischen Gründen, um synergistische oder additive Effekte nachzuweisen. Im Folgenden wird als Erstes auf die Ergebnisse der Dosis-Wirkungs-Versuche der Schädlings-

bekämpfungsmittel und *M. anisopliae* eingegangen. Anschließend werden die Wirkungen der Kombinationen vor dem Hintergrund von anderen Studien diskutiert.

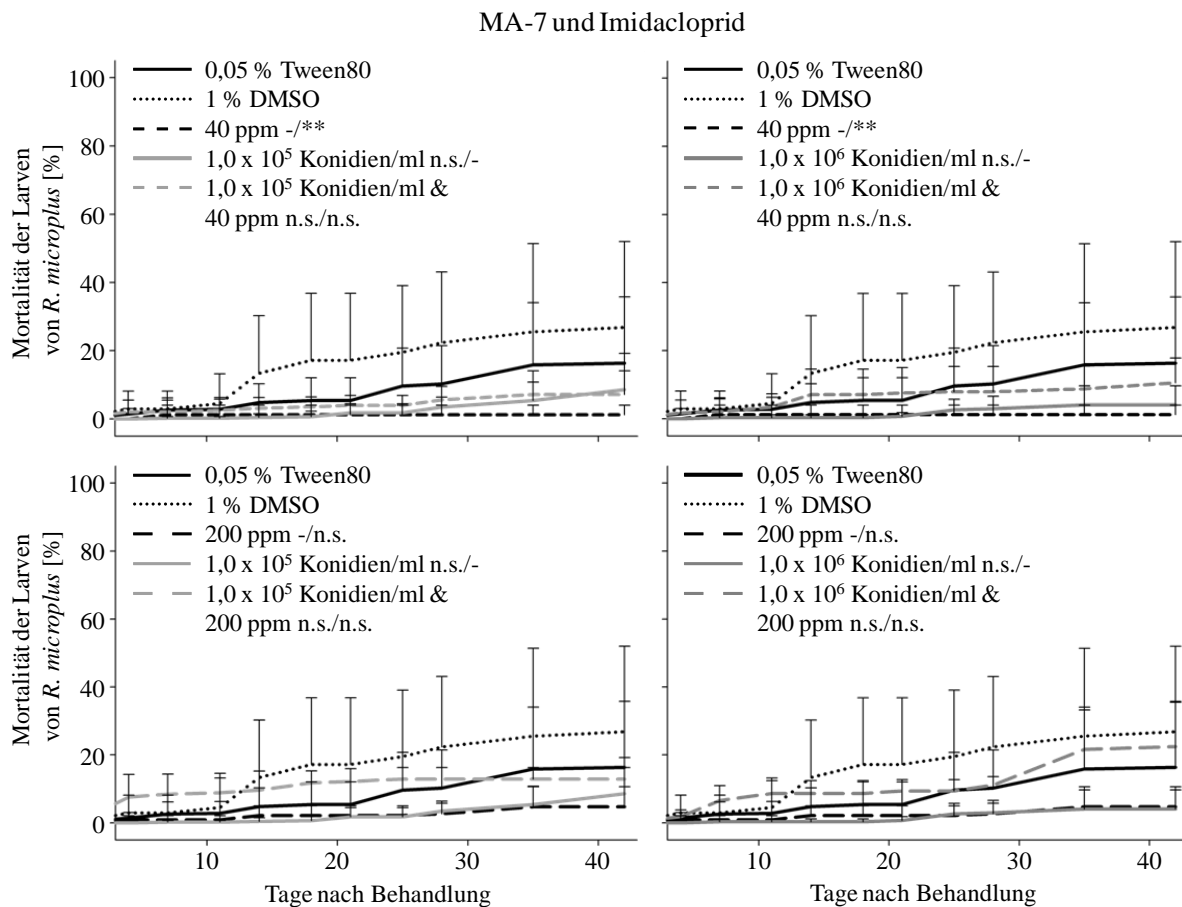


Abb. 65: Mortalität ($\bar{x} \pm s$) der ungesogenen Larven von *R. microplus* über den Versuchszeitraum von 42 Tagen. Behandelt wurden die Larven mit $1,0 \times 10^5$ oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml von MA-7 und mit 40 ppm oder 200 ppm Imidacloprid allein und in Kombination. Als Kontrollen dienten 0,05 % Tween80 und 1 % DMSO. Sternchen zeigen Unterschiede zwischen den Varianten und 0,05 % Tween80/1 % DMSO (U-Test nach Mann und Whitney) (n=6).

4.4.1 Subletale/subeffektive Konzentrationen der Schädlingsbekämpfungsmittel

Als mögliches Schädlingsbekämpfungsmittel für eine Kombination wurde zum einen Fipronil gewählt, da es eine schnelle Kontakt- und eine langanhaltende Residualwirkung hat (Blagburn und Lindsay 2001, Wiedemann 2000, Postal *et al.* 1995) und für Vertebraten weitestgehend ungefährlich ist (Ungemach 2010, Kunkle 1997). Der ermittelte EC_{50}/LC_{50} -Wert nahm von Weibchen, über Eier bis hin zu den Larven ab und wurde bei maximal 1,6 ppm erreicht. Andere Studien fanden sowohl für Weibchen als auch für Larven ähnliche Werte. Castro-Janer *et al.* (2009) ermittelten für vollgesogene Weibchen von *R. microplus*, die mit unterschiedlichen Fipronil-Konzentrationen behandelt wurden und nicht resistent gegenüber

Fipronil waren, einen LC₅₀-Wert von 0,75 (0,72 – 0,84) ppm. Für den getesteten resistenten Stamm lag dieser Wert bei 151,9 (140,2 – 163) ppm. Da die Autoren alle Weibchen, die keine Eier ablegten, als tot einstufen, können die Ergebnisse mit der vorliegenden Studie direkt verglichen werden. Der in der vorliegenden Studie ermittelte EC₅₀-Wert war leicht höher (1,53 ppm) und die Eimenge und die Schlupfrate betragen nach Behandlung mit 1,6 ppm weniger als 50 % im Vergleich zur Kontrolle, was ungefähr dem hier ermittelten EC₅₀-Wert für die Weibchen entsprach. Auch die von Castro-Janer *et al.* (2009) ermittelten EC₅₀-Werte für die abgelegte Eimenge nach sieben Tagen, die Fertilität und Fekundität waren nur leicht geringer (0,45 bis 0,66 ppm) als der von ihnen ermittelte LC₅₀-Wert für die Weibchen. Für direkt getestete Larven von verschiedenen nicht-resistenten Stämmen aus Uruguay lag der LC₅₀-Wert bei Anwendung eines Larvenimmersionstests zwischen 0,47 (0,4 – 0,5) ppm und 1,5 (1,3 – 1,7) ppm, während er für fipronilresistente Stämme größer als 4,86 (3,6 – 7,6) ppm war (Castro-Janer *et al.* 2010). Diese Ergebnisse stimmen mit den in dieser Studie gewonnenen Ergebnissen überein (LC₅₀-Wert für Larven: 0,26 ppm). Die Empfindlichkeit der Stadien gegenüber Schädlingsbekämpfungsmitteln scheint von Larven zu Adulten abzunehmen (Abdel-Shafy und Zayed 2002, Koch und Burkwhat 1984). Das entspricht den hier ermittelten Ergebnissen für Larven und Adulte von *R. microplus* gegenüber Fipronil. Zu Eiern gibt es vergleichsweise wenige Studien über die Empfindlichkeit gegenüber Schädlingsbekämpfungsmitteln. Den in dieser Studie gefundenen Ergebnissen zufolge, ist anzunehmen, dass Eier weniger empfindlich sind. Auch in anderen Studien waren Eier (u. a. von *Hyalomma [anatolicum] excavatum*, *Panonychus ulmi*, *Tetranychus urticae*) gegenüber verschiedenen Akariziden weniger sensitiv als Larven (Kramer und Nauen 2011, Abdel-Shafy und Zayed 2002, Munthali 1984). Zur Empfindlichkeit von Eiern, die direkt mit Fipronil behandelt wurden, konnten keine Studien gefunden werden. Eine Erklärung für die geringere Empfindlichkeit der Eier gegenüber Fipronil im Vergleich zu der der Larven könnte aber das Oberflächen-Volumen-Verhältnis der Eier sein. Zecken haben grundsätzlich ein relativ hohes und damit ungünstiges Oberflächen-Volumen-Verhältnis (z. B. Needham und Teel 1991, Hackman und Filshie 1982). Das Oberflächen-Volumen-Verhältnis von Eiern und Larven ist besonders hoch (Yoder *et al.* 2004, Yoder und Spielman 1992), während mit zunehmender Größe das Oberflächen-Volumen-Verhältnis kleiner, also günstiger, wird (Schmidt-Nielsen 1984). Auch wenn Eier ein schlechteres Oberflächen-Volumen-Verhältnis als vollgesogene Larven haben (Koch 1983, Norval 1977b), geht aus der Literatur nicht hervor, ob dieses auch für ungesogene Larven zutrifft. Ungesogene Stadien haben ein ungünstigeres Oberflächen-Volumen-Verhältnis als gesogene Stadien (Schmidt-Nielsen 1984) und Eier von *R. microplus*

sind durchschnittlich etwas größer (550 µm Länge, 400 µm Breite) als ungesogene Larven (500 µm Länge, 400 µm Breite) (Nuñez *et al.* 1985). Außerdem ist die Epikutikula vieler ixodider Zecken gefaltet (Hackman und Filshie 1982), wodurch die Oberfläche der ungesogenen Zecken zusätzlich vergrößert wird (Lighton *et al.* 1993). Es kann also davon ausgegangen werden, dass das Oberflächen-Volumen-Verhältnis der Eier etwas günstiger ist als das von den ungesogenen Larven. Weiterhin werden Eier in Eipaketen abgelegt, deren Form die Menge der geschlüpften Larven beeinflusst, da durch eine größere Oberfläche des Eipaketes mehr Eier den potenziell schädlichen Umweltbedingungen ausgesetzt werden (Kurup *et al.* 2008). Es ist also möglich, dass Fipronil aufgrund des besseren Oberflächen-Volumen-Verhältnisses auf die Eier schlechter als auf ungesogene Larven wirkte und Fipronil somit schlechter mit den Eiern in Kontakt kam (besonders mit denen im Inneren des Eipaketes). Weiterhin wäre es möglich, dass die Schutzhülle der Eier (zusätzlich) für Fipronil undurchlässig ist.

Die unbeweglichen Eier werden von den Weibchen bevorzugt in vor Umwelteinflüssen geschützten Mikrohabitaten abgelegt (Patrick und Hair 1979). Zusätzlich werden die Eier zweifach mit einer wasserabweisenden Wachsschicht eingekapselt. Eine erste, nicht komplette Wachsschicht erhalten die Eier während ihrer Passage durch die Vagina (Lees und Beament 1948). Mit der zweiten Wachsschicht werden die Eier erst außerhalb des Weibchens überzogen. Zur Produktion des Wachses und der Imprägnierung der Eier dient das Genésche Organ. Dieses liegt bis zum Beginn der Eiablage im Inneren des Körpers unter dem Capitulum (Diehl *et al.* 1982, Cherry 1969, Lees und Beament 1948). Zur Eiablage werden die sogenannten Hörner (im Englischen „horns“), ballonartige kutikuläre Säcke, vom Inneren des Weibchens nach außen gestülpt und die zuvor abgelegten Eier mit einer Wachsschicht (Booth 1989) umhüllt. Diese Wachsschutzschicht dient den Eiern, die weder Wasser aufnehmen noch ungünstige Umweltbedingungen vermeiden können (Yoder *et al.* 2004, Heath 1979), dazu das vorhandene Wasser zu halten (Yoder *et al.* 2004). Sie führt bei ixodiden Zecken weiterhin zum Aneinanderhaften der Eier zu Eipaketen (Diehl *et al.* 1982, Lees und Beament 1948) und schützt die Eier vor Pilzbefall und Mikroben (Lees und Beament 1948). Nicht „eingewachste“ Eier sind sehr permeabel sowohl für Wasser als auch für größere Moleküle (mit lipo- oder hydrophilen Eigenschaften). Im Gegensatz dazu sind Eier mit einer Wachsschicht wenig permeabel (Lees und Beament 1948).

Die Effektivität eines Schädlingsbekämpfungsmittels gegenüber Eiern kann je nach Spezies und auch Alter der Eier sehr verschieden ausfallen (Smith und Salkeld 1966). Diese unterschiedliche Empfindlichkeit kann von der Permeabilität der Schutzhüllen der Eier

beeinflusst werden. Es wäre also auch möglich, dass das Schädlingsbekämpfungsmittel nicht nur auf Grund des Oberflächen-Volumen-Verhältnisses, sondern auch wegen der geringen Permeabilität der Schutzhülle nicht zum Embryo vordringen kann, wodurch die geringere Empfindlichkeit der Eier im Vergleich zu der der Larven erklärt werden könnte. Die Ergebnisse der Versuche mit Eipaketen müssen aber mit Vorsicht betrachtet werden, da die Mortalität in der Kontrolle in allen Versuchen sehr hoch war, woraus zu schließen ist, dass die Versuchsbedingungen für die Embryonalentwicklung nicht optimal waren. Für die Schlupfrate ist das Oberflächen-Gewichts-Verhältnis der Eipakete und damit die Anzahl der Eier, die den Umweltbedingungen ausgesetzt sind, entscheidend. Einzelne Eier, die von den Eipaketen getrennt waren, schlüpften ebenso wenig, wie solche aus Eipaketen, die an der Wand des Versuchsgefäßes verteilt wurden, wodurch die Integrität des Eipaketes verloren ging (Kurup *et al.* 2008). Bei den Versuchen mit Eipaketen muss also auf die Unversehrtheit des ganzen Eipaketes geachtet werden. Weiterhin sind Eier für ihre Entwicklung auf eine hohe Luftfeuchte angewiesen (Yoder *et al.* 2004, Koch 1983). Es muss also bei den Versuchen zusätzlich auf Erhaltung der optimalen Luftfeuchte geachtet werden.

Da Fipronil zur Anwendung an Rindern nicht überall (u. a. Israel) zugelassen ist (Samish, persönliche Mitteilung), wurde zusätzlich Amitraz in die vorliegende Studie mit einbezogen, um im Rahmen der Studie (Trilaterales Projekt Deutschland-Israel-Palästina) auch einen in Israel relevanten Wirkstoff zu testen. Amitraz hat eine hohe Effektivität gegen Ektoparasiten und verfügt über eine repellente Wirkung (Ungemach 2010, Gupta 2007). Allerdings wirkte es gegenüber *R. microplus* schlechter als Fipronil, da für alle Stadien eine höhere LC₅₀-Konzentration benötigt wurde als für Fipronil. Der ermittelte Wert für die Weibchen (7,13 ppm) liegt aber in einem Bereich, der auch für andere sensitive Stämme ermittelt wurde. Bei einem Vergleich verschiedener US-amerikanischer und australischer Stämme von *R. microplus* bezüglich der Empfindlichkeit gegenüber Amitraz wurde sieben Tage nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Amitraz die Anzahl der Weibchen bestimmt, die keine Eier abgelegt hatten. Für Stämme, die nicht resistent gegenüber Amitraz waren, ergaben sich LC₅₀-Werte zwischen 0,000029 und 0,0031 % w/v (~ 0,29 bis 31 ppm) (Jonsson *et al.* 2007). Allerdings wurden die Weibchen deutlich länger (30 Minuten) mit den Amitraz-Lösungen in Kontakt gebracht als in der vorliegenden Studie (1 Minute). Oliveira *et al.* (2000) ermittelten nach einer Minute Immersion für vollgesogene Weibchen von *R. microplus* einen EC₅₀-Wert von 1,234 (0,8356 - 1,4931) ppm.

Der Vergleich der LC₅₀-Werte der Larven mit Werten aus der Literatur ist schwierig, da der LC₅₀-Werte für Larven in dieser Studie erst 14 Tage nach Behandlung berechnet wurde,

dieser in anderen Studien aber bereits nach 24 Stunden ermittelt wurde. In verschiedenen Versuchen mittels eines Kontakttests (im Englischen „larval packet test“) mit empfindlichen Larven von *R. microplus* wurden für Amitraz LC₅₀-Werte von ~ 15 ppm bis ~ 240 ppm (0,0015 [0,001 – 0,002] % bis 0,024 [0,02 – 0,046] % aktive Substanz) ermittelt (Barré *et al.* 2008, Davey *et al.* 2008, Ducornez *et al.* 2005). Es können aber auch je nach Resistenz des Stammes LC₅₀-Werte von ~ 278 ppm bis ~ 460 ppm (0,0278 [0,0252 – 0,0304] % bis 0,046 [0,040 – 0,053] % aktive Substanz) erreicht werden (Barré *et al.* 2008, Li *et al.* 2004). Verglichen mit diesen Werten waren die in dieser Studie getesteten Larven sehr empfindlich (LC₅₀-Wert von 0,17 ppm). Zur Empfindlichkeit von Eiern, die direkt mit Amitraz behandelt wurden, konnten keine Studien gefunden werden. Die in dieser Arbeit ermittelte bessere Wirkung von Amitraz auf Larven als auf Eier könnte aber, wie bei Fipronil, entweder durch das bessere Oberflächen-Volumen-Verhältnis der Eier oder mit der schlechten Permeabilität der Eischutzhülle erklärt werden.

Bei Behandlung der Larven mit Permethrin wurde ein recht hoher LC₅₀-Wert von ~ 179 ppm 14 Tage nach der Behandlung ermittelt. Andere Autoren geben für Larven empfindlicher Stämme von *R. microplus*, die mittels „larval packet tests“ getestet wurden, LC₅₀-Werte von 200 ppm bis 447 ppm (0,02 [0,018 -0,023] bis 0,0447 [0,0401 – 0,0496] % aktive Substanz) an (Li *et al.* 2008, Miller *et al.* 1999). Um zu überprüfen, ob es sich um einen resistenten Stamm handelt, müsste, laut Miller *et al.* (2007), die einfache und zweifache Dosis getestet werden, die bei einem empfindlichen Referenzstamm reichte, um 99 % der Larven nach 24 Stunden abzutöten. Dieses konnte in der vorliegenden Studie nicht durchgeführt werden, da kein sensitiver Vergleichsstamm vorlag; der errechnete LC₉₅-Wert war aber recht hoch (~ 7600 ppm). 1000 ppm töteten nur 75 % der Larven 14 Tage nach Behandlung und erst nach Einsatz von 5000 ppm starben 94 % der Larven im Versuchszeitraum. Fernandes (2001) erzielte für Larven, die eine Resistenz gegen Cypermethrin und Deltamethrin aufwiesen, durch Behandlung mit 1250 ppm bzw. 2500 ppm Permethrin eine Mortalität von 86,2 bzw. 100 % nach 24 Stunden. Miller *et al.* (2007) testeten zur Überprüfung, ob eine Resistenz vorliegt, 1250 und 2500 ppm Permethrin. Aufgrund der vergleichsweise hohen Konzentrationen, die in den vorliegenden Versuchen ermittelten wurden, kann davon ausgegangen werden, dass eine (leichte) Resistenz der Larven gegenüber Permethrin vorliegt. Auch die fehlende Empfindlichkeit der Eier ist ein Hinweis dafür, dass es sich um einen resistenten Stamm handelt. In der vorliegenden Studie mit circa sieben Tage alten Eiern wurde für eine 85 %ige Schlupfinhibition eine Konzentration von 1000 ppm benötigt. Davey (1995) ermittelte nach topikaler Applikation von Permethrin auf Eier verschiedener

Altersstufen, dass eine Schlupfinhibition von über 76 % erreicht werden konnte, wenn 21 Tage alte Eier mit 500 ppm Permethrin behandelt wurden. Bei zehn Tage alten Eiern konnte mit dieser Konzentration sogar eine 93 %ige Schlupfinhibition erzielt werden. Dass die Eier im Vergleich mit den Larven gegenüber Permethrin empfindlicher reagierten, steht im Gegensatz zu den Beobachtungen, die nach Behandlung mit den anderen Schädlingsbekämpfungsmitteln gemacht wurden. Da Permethrin sehr lipophil ist (Bromilow *et al.* 2003), könnte die höhere Empfindlichkeit der Eier mit der besseren Durchlässigkeit von Permethrin durch die Wachsschicht der Eier erklärt werden. Eine andere Möglichkeit wäre, dass der Mechanismus der Resistenz bei den Eiern evtl. noch nicht oder nicht in ausreichendem Maße etabliert ist. Bei anderen Arthropoden (u. a. Weiße Fliege, Schmetterlingen, Milben) gibt es bezüglich der Ausprägung von Resistenzen einen Alterseffekt, bei dem die ersten Stadien im Gegensatz zu den späteren Stadien noch keine oder nur eine sehr geringe Resistenz ausgebildet haben (Kramer und Nauen 2011, Karatolos *et al.* 2010, Nauen *et al.* 2008, Prabhaker *et al.* 1989). Zum Beispiel waren die Eier eines resistenten Stamms von *T. urticae*, u. a. gegenüber Spirodiclofen, empfindlicher als Larven (Kramer und Nauen 2011). Auch bei vorhandener Pyrethroidresistenz wurde eine Abnahme der Sensitivität mit zunehmendem Entwicklungsstadium nachgewiesen (Prabhaker *et al.* 1989, Daly *et al.* 1988). Laut Nauen *et al.* (2008) kann der Alterseffekt bei Resistenzen immer dann auftreten, wenn die Resistenz durch erhöhte Produktion eines detoxifizierenden Enzyms zustande kommt, welches nur in einigen Stadien in hohem Maße produziert wird.

Als Ursache für die Resistenz von *R. microplus* gegenüber Pyrethroiden werden hauptsächlich zwei Mechanismen angenommen (Pruett *et al.* 2002, Guerrero *et al.* 2002, Guerrero *et al.* 2001, Miller *et al.* 1999). In verschiedenen Studien konnte eine Mutation eines Natriumkanals identifiziert werden (Guerrero *et al.* 2001, He *et al.* 1999, Miller *et al.* 1999), wodurch die Bindungsstelle für Pyrethroide verloren geht. Außerdem wurde eine Esterase (EST9 [expressed sequence tag]), die Pyrethroide hydrolysieren kann, gefunden (Guerrero *et al.* 2002, Pruett *et al.* 2002, Miller *et al.* 1999). Baffi *et al.* (2007) untersuchten die Esterase-Aktivität für alle postembryonalen Stadien eines empfindlichen Stammes von *R. microplus*. Die Autoren konnten eine konstante und hohe Genaktivität von EST9 in allen postembryonalen Stadien nachweisen und gehen davon aus, dass es sich dabei um eine Carboxylesterase handelt. Baffi *et al.* (2007) fanden weiterhin, dass der Anteil der Esterase-Aktivität in Larven und der ersten Nymphenphase am höchsten war, was auf die unterschiedliche Genexpression von Esterase (Juvenilhormonmetabolismus, hohe mitotische Aktivität und große Menge an aufgenommenem Blut) in den einzelnen Stadien

zurückzuführen ist. Im Vergleich zu einem empfindlichen Stamm von *R. microplus* überexprimierten resistente Stämme EST9 (Cossío-Bayúgar *et al.* 2009, Jamroz *et al.* 2000). Die Carboxylesterase-Aktivität nahm bei ungesogenen Larven mit zunehmendem Alter zu und erreichte ihr Maximum 20 bis 30 Tage nach dem Schlupf (Miranda-Miranda *et al.* 2009). Es wurde aber bereits bei einen Tag alten Larven unabhängig von ihrer Empfindlichkeit gegenüber Schädlingsbekämpfungsmitteln eine Grundaktivität von Carboxylesterasen gefunden (Miranda-Miranda *et al.* 2009). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass Carboxyl-Esterasen auch in den Embryonen von *R. microplus* gebildet werden und eine zentrale Bedeutung für die Resistenzausprägung haben. Allerdings gibt es zur Esterase-Aktivität in Eiern von *R. microplus* bislang keine Untersuchungen.

Das als Insektizid zugelassene Imidacloprid kann gegen Zecken wirken. Allerdings ist die Effizienz schlechter als bei für die Zeckenkontrolle zugelassenen Präparaten (Cruthers *et al.* 1999). Daher überrascht es nicht, dass nur hohe Konzentrationen (> 200 ppm) die Larven abtöten konnten und die weniger empfindlichen Eier selbst mit 5000 ppm nicht ausreichend abgetötet werden konnten.

Die Eier von *R. microplus* reagierten ebenfalls deutlich weniger empfindlich auf NeemAzal als die Larven, deren berechneter LC₅₀-Wert mit ~ 2500 ppm allerdings auch sehr hoch war. Al-Rajhy *et al.* (2003) berichten über *Hyalomma dromedarii*, dass Azadirachtin in Konzentrationen bis 5000 mg/l (5000 ppm) keinen Effekt auf die Eiproduktion oder die Blutaufnahme der Adulten hatte. Der LC₅₀-Wert wurde für Larven mit > 2500 mg/l (2500 ppm) angegeben. Allerdings wurde die Blutaufnahme der Larven und der Anteil der Larven, die nach Blutaufnahme zu Nymphen schlüpften, bereits ab einer Konzentration von 500 mg/l (500 ppm) negativ beeinflusst. Eier von *H. [anatolicum] excavatum*, die mit 1,6 – 12,8 % (16.000 – 128.000 ppm) NeemAzal F (5 % Azadirachtin) behandelt wurden, erreichten eine Schlupfrate von bis zu 60 %, während in der Kontrolle aus 72 % der Eier Larven schlüpften. Behandelte ungesogene Larven waren hingegen empfindlicher als die Eier. Bereits drei Tage nach Behandlung mit 1,6 % (16.000 ppm) NeemAzal F wurde eine 100 %ige Mortalität erreicht und der errechnete LC₅₀-Wert für Larven lag bei 0,5 % (~ 5000 ppm) (Abdel-Shafy und Zayed 2002). Giglioti *et al.* (2011) testeten unterschiedliche Konzentrationen (bis 1280 ppm) von Extrakten aus dem Neemsamen im „larval packet test“ an 14 – 21 Tage alten Larven von *R. microplus*, konnten aber 48 Stunden nach Behandlung keine Mortalität feststellen. Die hier ermittelten LC₅₀-Werte sind für Präparate auf Neembasis also nicht ungewöhnlich. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von mehr als 1000 ppm NeemAzal in *Aq. dest.* mit 1 % DMSO und der nicht getesteten Kompatibilität der

M. anisopliae-Stämme mit so hohen NeemAzal-Konzentrationen wurden keine Kombinationsversuche mit NeemAzal durchgeführt.

4.4.2 Konzentrationsabhängige Wirkungsgrade von MA-K und MA-7

In den Dosis-Wirkungs-Versuchen nahm die Mortalität der behandelten vollgesogenen Weibchen konzentrationsabhängig zu. Eine 100 %ige Mortalität konnte nach Behandlung mit $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml erreicht werden. Der LC_{50} -Wert wurde (isolatsabhängig) mit $1,1 - 2,56 \times 10^6$ Konidien/ml berechnet. Ähnliche Werte ($1,4 - 2,3 \times 10^7$ Konidien/ml bzw. $1,1 - 2,2 \times 10^6$ Konidien/ml – *M. anisopliae*-Stamm abhängig) konnten auch Onofre (2001) bzw. Bittencourt *et al.* (1992) ermitteln. Aber auch andere Autoren beschreiben eine isolatsabhängige, bis zu 100 %ige Mortalität der Weibchen 10 – 14 Tage nach Behandlung mit $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml (z. B. Frazzon *et al.* 2000). Unter anderem nahm die Dauer der Eiablage nach Behandlung der Weibchen mit *M. anisopliae* mit zunehmender Konzentration ab und reduzierte sich von circa zehn Tagen in der Kontrolle auf drei nach Behandlung mit $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml (Melo *et al.* 2006). Des Weiteren konnte die abgelegte Eimenge und die Schlupfrate konzentrationsabhängig ($1,0 \times 10^4 - 10^8$ Konidien/ml) reduziert werden (Melo *et al.* 2006, Bittencourt *et al.* 1992), wie es auch in den vorliegenden Versuchen der Fall war. Die Autoren machen aber nicht deutlich, ob sich die ermittelten Gewichte der Eier und die Schlupfrate auf alle getesteten Weibchen (lebendig und tot) beziehen. In der vorliegenden Studie kam die Reduktion der durchschnittlichen Eimenge einzig durch die getöteten Weibchen zu Stande. Die Eiablagekapazitäten der lebendigen Weibchen wurden durch die Behandlung mit MA-K oder MA-7 nicht beeinträchtigt. Die beiden getesteten Stämme verursachen also anscheinend keine (messbaren) subletalen Effekte. Die Schlupfrate wurde aber unabhängig von dem Vitalstatus des Weibchens vermindert. Da die Infektion der Eier umso stärker war, wenn die Weibchen mit Myzel überzogen waren und sich bereits Konidien ausgebildet hatten, kann in diesem Fall von einer Sekundärinfektion ausgegangen werden, wie sie auch von anderen Autoren berichtet wird (Langewald *et al.* 1999, Baker *et al.* 1994). Wenn aber die Weibchen bis zur Trennung von den Eiern 14 Tage nach Behandlung noch am Leben waren, muss eine Sekundärinfektion über neu gebildete Konidien ausgeschlossen werden. In diesem Fall ist die konzentrationsabhängig ansteigende Eimortalität eher damit zu erklären, dass die Eier mit den Konidien aus der Tauchbehandlung in Berührung kamen. Diese „alten“ Konidien befanden sich entweder an der Kutikula der Weibchen oder auf dem Filterpapier. Mit entomopathogenen Pilzen infizierte *Glossina morsitans morsitans* infizierten auch initial nicht-infizierte Artgenossen und das unabhängig vom Geschlecht, was darauf

schließen lässt, dass nicht nur während der Paarung Konidien übertragen werden, sondern geringfügiger physischer Kontakt zur Konidienübertragung ausreicht (Kaaya und Okech 1990). Es traten auch im Freiland bis zwölf Tage nach Applikation Neuinfektionen bei *Hieroglyphus daganensis* auf, die aufgrund des noch nicht vorhandenen Myzels auf Kadavern auf Konidien-Sprührückstände zurückzuführen waren (Thomas *et al.* 1997). Auch Langewald *et al.* (1999) sind der Meinung, dass Konidien-Sprührückstände bis drei Wochen nach Applikation infektiös sein können. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass sich die Eier noch im Weibchen mit evtl. schon vorhandenen Protoplasten von *M. anisopliae* infizierten.

Werden Eier direkt mit Konidien suspension behandelt, nimmt die Schlupfrate der Larven mit zunehmender Konzentration von *M. anisopliae* ab. Dieses wurde auch in anderen Studien beobachtet, u. a. konnte eine Schlupfinhibition von 2,8 – 76 % nach Behandlung der Eier mit $1,0 \times 10^4 - 10^8$ Konidien/ml von *M. anisopliae* beobachtet werden (Fernandes *et al.* 2004, Onofre *et al.* 2001). Die Behandlung von sieben Tage alten Eiern von *Rhipicephalus annulatus* mit MA-K oder MA-7 verhinderten den Larvenschlupf aus allen behandelten Eiern (Gindin *et al.* 2009). Die applizierte Konzentration von MA-K und MA-7 geht aus der Studie jedoch nicht klar hervor; getestet wurden Konzentrationen von $1,0 \times 10^5 - 1,0 \times 10^8$ Konidien/ml. Die ermittelten LC_{50} -Werte von $3,72 \times 10^4$ (MA-7) bzw. $7,87 \times 10^6$ (MA-K) Konidien/ml entsprechen ungefähr den Werten, die Bittencourt *et al.* (1994a) für verschiedene Pilzstämme ($1,35 - 5,0 \times 10^6$ Konidien/ml) für Eier von *R. microplus* ermittelten.

Auch bei den Larven ergab sich eine konzentrationsabhängig zunehmende Mortalität nach Behandlung mit MA-7 oder MA-K. Die LC_{50} -Werte der Larven für MA-K ($8,32 \times 10^6$ Konidien/ml) und MA-7 ($5,39 \times 10^4$ Konidien/ml) waren zwar unterschiedlich, da jedoch keine signifikanten Wirkungsunterschiede der einzelnen Konzentrationen beider *M. anisopliae*-Stämme auf die Larven gefunden werden konnte, wurde die Wirkung als gleich eingestuft. Ähnliche, je nach Stamm abhängige LC_{50} -Werte ($2,0 - 5,6 \times 10^6$ Konidien/ml) für Larven von *R. microplus* (zehn Tage nach Behandlung) ermittelten auch Bittencourt *et al.* (1994a). Fernandes *et al.* (2004) konnten die Mortalität von Larven von *R. microplus* mit Konzentrationen von $1,0 \times 10^5 - 10^8$ Konidien/ml von drei verschiedenen Stämmen von *M. anisopliae* zehn Tage nach Behandlung ebenfalls erhöhen (11 – 94 %).

Beide Pilzstämme hatten für Weibchen und Larven ein sehr ähnliches Wirkspektrum. Lediglich die Eier reagierten im Unterschied zu den Weibchen und Larven empfindlicher auf MA-7, wohingegen MA-K eine ähnliche Wirkung auf Eier wie auf Larven und Weibchen hatte. In anderen Studien wurde beobachtet, dass ungesogene Larven von *R. annulatus*, *H. excavatum* und *Rhipicephalus sanguineus* empfindlicher reagierten als vollgesogene

Weibchen (Gindin *et al.* 2002, Gindin *et al.* 2001). Die Eier von *R. annulatus* oder *R. microplus* waren hingegen entweder ähnlich empfindlich wie die Larven (Fernandes *et al.* 2004, Gindin *et al.* 2002) oder weniger empfindlich (Gindin *et al.* 2001). Aus diesen unterschiedlichen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Zeckenart und ihr Stadium eine ebenso wichtige Rolle bei der Bestimmung der Empfindlichkeit gegenüber einem entomopathogenem Pilz spielt wie der eingesetzte Pilzstamm selbst (Gindin *et al.* 2009, Fernandes *et al.* 2004).

4.4.3 Kombinationen aus *M. anisopliae* und Schädlingsbekämpfungsmitteln

4.4.3.1 Vollgesogene Weibchen

4.4.3.1.1 *M. anisopliae* und Fipronil

Bei Behandlung der Weibchen mit Kombinationen aus MA-K und Fipronil waren alle bis auf eine Kombination additiv. Lediglich die Kombination aus $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K und 0,064 ppm Fipronil war antagonistisch. Bei MA-7 hingegen wurde die höchste Konzentration von $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml in Kombination mit 0,32 ppm als antagonistisch eingestuft, während alle anderen Kombinationen additive Effekte aufwiesen.

Dies ist überraschend, da bei den Kompatibilitätsstudien alle getesteten Konzentrationen als kompatibel mit MA-K eingestuft wurden und alle bis auf 200 ppm als kompatibel mit MA-7 galten. Allerdings wurde das vegetative Wachstum von MA-K und MA-7 durch 1,6 ppm oder mehr negativ beeinflusst. Obwohl einige Autoren davon ausgehen, dass die Auswirkungen auf den Pilz bei einer kombinierten Anwendung am Wirt geringer sein sollte als in einem *in vitro* Testsystem zur Bestimmung der Kompatibilität (Neves *et al.* 2001, Alves *et al.* 1998), wurden in Studien auch Unterschiede zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Versuchen hinsichtlich der Effizienz von entomopathogenen Pilzen unter Einfluss von verschiedenen Schädlingsbekämpfungsmitteln gefunden (Mietkiewski *et al.* 1997). Eine mögliche Ursache für Unterschiede beim Vergleich von *in vivo* mit *in vitro* Studien können die variablen mikroklimatischen Bedingungen sein sowie Konzentrationsunterschiede der angewendeten Schädlingsbekämpfungsmittel. Diese Faktoren können als Fehlerquelle allerdings in der vorliegenden Studie ausgeschlossen werden. Bei einem kombinierten Einsatz von Schädlingsbekämpfungsmitteln und *M. anisopliae* an Zecken *in vitro* werden zwar die Umweltbedingungen konstant gehalten, es kommen aber Faktoren (z. B. die Kutikulabeschaffenheit) hinzu, die bei den Kompatibilitätstests nicht berücksichtigt werden, aber die Wirkung des Pilzes beeinflussen (Ment *et al.* 2010).

Die Konidien-Konzentration von $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml lag auch geringfügig unter der, die in anderen Studien für Kombinationsversuche benutzt wurde (z. B. Moino Jr. und Alves 1998, Hiromori und Nishigaki 1998, Hassan und Charnley 1989). Möglich wäre im vorliegenden Fall, dass 0,064 ppm Fipronil negative Auswirkungen auf $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K hatte und dass dadurch nicht mehr genügend lebensfähige Konidien vorhanden waren, um eine Mortalität zu verursachen. Gleichzeitig schwächte 0,064 ppm Fipronil die Weibchen nicht ausreichend, so dass die Mortalität in der Kombination unter der in der MA-K-Behandlung allein zurückblieb. Andererseits könnte in der Kombination mit 0,32 ppm Fipronil zwar auch die Anzahl der lebensfähigen Konidien reduziert worden sein; es ist aber möglich, dass dieses durch die stärkere Wirkung von Fipronil auf die Weibchen ausgeglichen wurde.

Schwieriger hingegen ist zu erklären, warum die Kombination aus $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml MA-7 und 0,32 ppm Fipronil antagonistisch war, obwohl sich bei den geringeren Konidien-Konzentrationen mit dieser Fipronil-Konzentration ein additiver Effekt einstellte. Wie man anhand der Chancenverhältnisse und Mortalitätskurvenverläufe aber sehen kann, verursachte die Kombination aus $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml MA-7 und 0,32 ppm Fipronil bereits eine etwas geringere Mortalität als $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml MA-7. Diese war aber nicht ausreichend, um die Kombination als antagonistisch einzustufen. Die Mortalität in der Kombinationsbehandlung von $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml MA-7 und 0,32 ppm blieb ungefähr auf dem Niveau der Mortalität der Behandlung mit $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml MA-7, was als weiteres Indiz gesehen werden kann, dass 0,32 ppm Fipronil die Lebensfähigkeit der Konidien beeinflusste.

Andere Kombinationsstudien, die GABAerge Chloridkanal-Antagonisten (Wirkstoffklasse von Fipronil) untersuchten, hatten die Kontrolle von Insekten als Ziel. Dabei wurden leicht antagonistische bis synergistische Effekte gefunden. Bei der kombinierten Anwendung von Endosulfan und *Beauveria bassiana* bzw. *M. anisopliae* gegen *Spodoptera litura* wurden synergistische Effekte ermittelt. Die Virulenz von *M. anisopliae* konnte dabei in Kombination mit Endosulfan um das 1,24-fache gesteigert werden (Dayakar *et al.* 2001). In einer anderen Studie gab es aber bei der Kombination von Endosulfan mit *B. bassiana* oder *M. anisopliae* gegen *Spilarctia obliqua* keine Unterschiede in Bezug auf die Mortalität zwischen der Kombination und der Endosulfan-Konzentration allein (Purwar und Sachan 2006). Gegen die Termitenart *Heterotermes tenuis* brachte die Kombination aus *M. anisopliae* und Fipronil keine sichtbaren Effekte. Die Autoren führten dies auf die fehlende Beeinflussung des Putzverhaltens der Termiten durch Fipronil zurück, weshalb es *H. tenuis* möglich war die Konidien zu entfernen (Moino Jr. und Alves 1998).

Beide Pilzstämme hatten weder allein noch in Kombination einen Einfluss auf die Menge der abgelegten Eier, wenn die Weibchen mit $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml behandelt wurden. Die ansteigende Konidienkonzentration hatte, genau wie in den Versuchen zur Bestimmung des LC_{50} -Wertes, einen zunehmenden Effekt auf Eimenge und Schlupfrate (siehe 4.4.2 *Konzentrationsabhängige Wirkungsgrade von MA-K und MA-7*). Ab Konzentrationen von $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml (mit Ausnahme der Kombination von $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml MA-7 und 0,32 ppm Fipronil) war sowohl die Eimenge als auch die Schlupfrate geringer als in den Kontrollen. Allerdings gab es keinen Unterschied zwischen den Behandlungen mit *M. anisopliae* allein und den Kombinationen. Genau wie in den Versuchen zur Ermittlung des LC_{50} -Wertes von *M. anisopliae* zeigte sich auch in den Kombinationsbehandlungen, dass die ermittelte Reduzierung der Eimenge eine Folge des Absterbens der Weibchen vor Vollendung der Eiablage war. Es konnten auch keine subletalen Effekte der Kombinationen auf die abgelegte Eimenge von lebenden Weibchen gefunden werden.

Die Schlupfrate war aber in jeder Behandlung mit *M. anisopliae* geringer als in den Kontrollen und den Fipronil-Behandlungen. Dieser Effekt war einzig auf die Fähigkeit der Pilzstämme zurückzuführen, sekundäre Infektionen hervorzurufen (Thomas *et al.* 1995, Kaaya und Okech 1990). Dabei waren die Schlupfraten in den Behandlungen mit MA-7 geringer als die in den MA-K-Behandlungen. Der Stamm MA-7 scheint also ein höheres Potenzial für Sekundärinfektionen zu besitzen als MA-K. Auch ist hier das Verhältnis der Schlupfrate der Behandlungen zu den Kontrollen unabhängig von dem Überleben der Weibchen. Dies zeigt damit das Potenzial des Pilzes, auch andere als das ursprünglich inokulierte Stadium zu bekämpfen.

4.4.3.1.2 *M. anisopliae* und Amitraz

Bei Kombination von $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K mit 1,6 ppm Amitraz gab es eine antagonistische Interaktion. Die Kombinationen aus $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-7 mit 0,32 oder 1,6 ppm Amitraz erwiesen sich als synergistisch. Alle anderen Kombinationen konnten als additiv eingestuft werden.

Ähnlich wie bei Fipronil waren alle getesteten Konzentrationen von Amitraz in den Kompatibilitätsversuchen mit MA-K und MA-7 als kompatibel eingestuft worden. Die Keimrate und das vegetative Wachstum wurden, wenn überhaupt, positiv beeinflusst (von 0,32 und 1,6 ppm). Trotz dieser Einstufung schien die höhere Amitraz-Konzentration (1,6 ppm) in den Kombinationsversuchen einen negativen Effekt auf $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K zu haben. Ursache ist wahrscheinlich, dass Amitraz sich negativ auf die Konidien

auswirkte und somit nicht mehr genügend lebensfähige Konidien von MA-K vorhanden waren, um eine Mortalität zu verursachen.

Auf der anderen Seite stärkte Amitraz den Pilzstamm MA-7 in der angewendeten Konzentration von $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml entweder direkt oder erleichterte durch die Herabsetzung des Immunsystems der Zecke den Infektionsprozess. In den höheren Konzentrationen fiel dieses weniger stark ins Gewicht, was an der zunehmenden Schädigung der Konidien gelegen haben könnte. Anhand der Chancenverhältnisse von den Kombinationen aus $1,0 \times 10^6$ oder $1,0 \times 10^7$ Konidien/ml MA-7 und Amitraz sieht man, dass die Mortalitäten, die diese Kombinationen verursachten, sich auf ungefähr einem Niveau befanden. Es konnte bei diesen Konzentrationen aber kein negativer Effekt von Amitraz auf MA-7 nachgewiesen werden.

Bei der Eiablage hatte 1,6 ppm Amitraz allein einen deutlichen Effekt, der auch unabhängig von den toten Weibchen erzielt wurde. Die Eimenge und Schlupfrate in den Kombinationen waren geringer als in den Kontrollen. Es erreichten aber nur die Kombinationen aus $1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml MA-K und 1,6 ppm Amitraz eine Reduktion der Schlupfrate im Vergleich zur Amitraz-Behandlung. Die Schlupfrate wurde eher von den Pilzstämmen als von Amitraz beeinflusst, während die abgelegte Menge der Eier eher von Amitraz bestimmt wurde. Auch nach Behandlung mit der Kombination aus MA-7 und 1,6 ppm legten Weibchen zwar mehr Eier als nach Behandlung mit Amitraz allein; die Schlupfrate in den Kombinationen mit $1,0 \times 10^7$ und $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml MA-7 war aber signifikant geringer als in den Kontrollen und in der Behandlung mit 1,6 ppm Amitraz. Auch die Kombinationen mit 0,32 ppm Amitraz hatten, genau wie 0,32 ppm Amitraz allein, keinen Einfluss auf die Menge abgelegter Eier. In den Kombinationen war die Schlupfrate niedriger als in der Behandlung mit 0,32 ppm Amitraz allein, aber nicht unterschiedlich zu MA-7. Da MA-K und MA-7 weder in den Dosis-Wirkungs-Versuchen noch in den Kombinationsversuchen mit Fipronil einen direkten Einfluss auf die Eiablage hatten, ist davon auszugehen, dass die Inhibition der Eiablage der Behandlung mit 1,6 ppm Amitraz zugeschrieben werden kann, was auch in anderen Versuche mit Amitraz gezeigt wurde (Ribeiro *et al.* 2010, Oliveira *et al.* 2000). Allerdings wird bei Vorliegen eines antagonistischen Effektes ($1,0 \times 10^6$ Konidien/ml in Kombination mit 1,6 ppm) auch die Inhibition der Eiablage durch Amitraz abgeschwächt. Es konnten mit Amitraz keine Kombinationsstudien gefunden werden, was daran liegen könnte, dass die Versuche anderer Autoren zur Kompatibilität negativ ausgefallen waren (Alizadeh *et al.* 2007, de Oliveira und Neves 2004). Da Amitraz der einzige Vertreter seiner

Wirkklasse ist, konnten keine Studien mit verwandten Stoffen zum Vergleich herangezogen werden.

Wenn sich eine Konzentration von Amitraz finden ließe, die zwar die Eimenge der behandelten Weibchen aber nicht den Pilz beeinflusst, wäre dies eine gute Kontrollmöglichkeit, um sowohl die Menge der Eier als auch der Larven zu reduzieren. Der Tod der Weibchen ist nur insofern von Bedeutung, da so die Eiablage verhindert wird. Wenn Eier und Larven aber auch anders kontrolliert werden können, ist die Kontrolle von vollgesogenen Weibchen unerheblich, da das Weibchen ohnehin nach Beendigung der Eiablage stirbt (Nuñez *et al.* 1985).

Auch in diesen Versuchen zeigte sich, wie bereits in anderen Studien (Fernandes *et al.* 2004), dass zwei Pilzstämme der gleichen Art eine durchaus unterschiedliche Virulenz gegenüber bestimmten Zielorganismen haben können, was auch an den unterschiedlichen Schlupfraten der Eier nach Behandlung der Weibchen mit MA-7 oder MA-K beobachtet werden konnte.

4.4.3.2 Eier

Nach Behandlung von circa sieben Tage alten Eiern gab es keine Unterschiede bei Schlupfbeginn oder -dauer, obwohl zahlreiche Autoren eine Verzögerung des Schlupfs durch entomopathogene Pilze nachweisen konnten. Bei Bittencourt *et al.* (1994b) führte die Behandlung von Eiern von *R. microplus* mit Konzentrationen von $1,0 \times 10^5$ – $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml von *M. anisopliae* zu einem verspäteten Schlupfbeginn und zu einer verlängerten Schlupfdauer. Auch Polar *et al.* (2005) fanden, dass die Behandlung von Eiern mit *M. anisopliae* die Schlupfrate verringerte (nur 15 % Schlupfrate nach Behandlung mit $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml) und die mittlere Schlupfdauer um ein Viertel verlängert wurde (von $14,8 \pm 0,5$ Tagen in der Kontrolle auf $19,8 \pm 0,5$ Tage [nach Behandlung mit $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml]). Hingegen konnten Fernandes *et al.* (2004) weder eine Verzögerung des Schlupfbeginns noch eine Verlängerung der Schlupfdauer feststellen. Bei einem der drei getesteten *M. anisopliae*-Stämme kam es nach Behandlung mit $1,0 \times 10^8$ Konidien im Gegenteil zu einer Verkürzung der Schlupfdauer.

Einzig die Schlupfrate in der Behandlung mit der Kombination aus $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml MA-K und 1,6 ppm Fipronil war geringer als in den Kontrollen und geringer als bei MA-K allein. Da es aber keinen Unterschied zu der Schlupfrate in der Fipronil-Behandlung gab, kann davon ausgegangen werden, dass dieser Effekt nicht durch die Kombination, sondern einzig durch Fipronil bedingt war. Alle anderen Behandlungen führten zu keiner geringeren Schlupfrate im Vergleich zu den Kontrollen. Auch in den Behandlungen mit Amitraz und

Permethrin unterschieden sich die Schlupfraten nicht von denen in der Kontrolle. Aufgrund der geringen Anzahl an Versuchswiederholungen in Verbindung mit sehr niedrigen Schlupfraten in den Kontrollen war es schwierig, Behandlungen zu finden, die signifikant unterschiedliche Schlupfraten verursachen können.

Außerdem lagen alle Schlupfraten in den Behandlungen mit MA-K oder MA-7 allein deutlich über 50 %, so dass sie einen zu geringen Wirkungsgrad hatten. Bei den Versuchen zur LC-Wert Bestimmung wirkten beide Pilzstämme deutlich besser, was sich in den niedrig gewählten Konzentrationen widerspiegelte. Um eine vernünftige Aussage über die Interaktion von MA-K oder MA-7 mit den Schädlingsbekämpfungsmitteln treffen zu können, müssten die Versuche wiederholt werden. Vorher sollte jedoch die Methodik verbessert werden, um in den Kontrollen eine stabil hohe Schlupfrate zu erzielen.

4.4.3.3 Larven

Die Mortalität der Pilzstämme allein lag innerhalb des vergleichsweise langen Versuchszeitraums von 42 Tagen bei maximal 20 %. Gleichzeitig war die Mortalität in den Kontrollen sehr hoch (20 – 30 %), unterlag in den einzelnen Wiederholungen aber starken Schwankungen (Standardabweichungen, die größer als der Mittelwert waren). Es ist daher davon auszugehen, dass das Testsystem nicht hinreichend stabil war, um verlässliche Aussagen zu produzieren. Diese niedrige Ausgangsmortalität war unter Umständen dafür verantwortlich, dass es nicht möglich war, eine eindeutige negative oder positive Interaktion der meisten Schädlingsbekämpfungsmittel mit den Pilzstämmen nachzuweisen. Eine Ursache für die hohe Larvenmortalität in den Kontrollen mag an der nicht ausreichenden Luftfeuchte im Testsystem gelegen haben. Die Überlebensdauer von Larven nimmt mit abnehmender Luftfeuchte und/oder zunehmender Temperatur ab (Davey *et al.* 1991). Auch wenn die Temperatur in den Versuchssystemen konstant gehalten werden konnte, war es schwierig, eine gleichbleibend hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten. Darüber hinaus war es aufgrund der kleinen Testbehälter (Rollrandgläser [10 ml] in einer Bellablast Schale [17 cm x 12 cm x 6,2 cm]) nicht möglich, die Luftfeuchte in diesem System zu ermitteln. Die sehr wahrscheinlich schwankende Luftfeuchte könnte für die hohen Variabilitäten in der Mortalität (ersichtlich an den großen Unterschieden der einzelnen Wiederholungen) verantwortlich gewesen sein. Auch *M. anisopliae* ist bei hoher Luftfeuchte effektiver (Luz *et al.* 1998, Walstad *et al.* 1970) und kann das volle Virulenzpotenzial nur unter optimalen Bedingungen ausschöpfen. Es können von diesen Ergebnissen also nur vorsichtige Schlüsse bezüglich der Effekte der Kombinationen gezogen werden.

Zwei der getesteten Kombinationen aus *M. anisopliae* und Fipronil konnten synergistische Effekte erzielen. $1,0 \times 10^5$ und $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K in Kombination mit 0,064 ppm Fipronil (die höhere der getesteten Fipronil-Konzentrationen) erzielten deutlich höhere Mortalitäten als die Einzelbehandlungen. Auch die Mortalität in der Kombination aus $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-7 und 0,0128 ppm Fipronil war in der Tendenz höher als die in den Einzelbehandlungen. Eine Beeinflussung des Verhaltens der Larven durch Fipronil ist nicht sehr wahrscheinlich, da Fipronil auch in einem anderen Kombinationsversuch mit *M. anisopliae* zur Bekämpfung von *H. tenuis* keinen Einfluss auf das Putzverhalten hatte (Moino Jr. und Alves 1998). Andere die Pilzinfektion begünstigende Verhaltensänderungen, z. B. ein erhöhter Bewegungsdrang, was die Chance mit Konidien in Kontakt zu kommen erhöhte (Quintela und McCoy 1998a), kann ausgeschlossen werden, da die Konidien bereits auf der Larvenkutikula hafteten. Es kann also davon ausgegangen werden, dass Fipronil das Immunsystem der Larven schwächte und somit dem Pilz die Infektion erleichterte. Ein weiteres Indiz ist, dass 0,064 ppm Fipronil auch allein eine Mortalität (~ 40 %) verursachte, also einen deutlichen Effekt auf die Larven hatte.

Bei allen Kombinationen mit Amitraz konnten keine Unterschiede gegenüber den Kontrollen gefunden werden. Aufgrund der bereits beschriebenen Problematik des Versuchsaufbaus (Luftfeuchte – siehe oben) muss der Versuch wiederholt werden, um eine verlässliche Aussage treffen zu können, ob Amitraz tatsächlich keinen Einfluss auf die durch *M. anisopliae* verursachte Mortalität hat.

Die Kombination aus $1,0 \times 10^5$ Konidien/ml MA-K oder $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-7 und 40 ppm Permethrin hingegen verursachte eine geringere Mortalität als die DMSO-Kontrolle. Die Chancenverhältnisse aller vier *M. anisopliae* Kombinationen mit 40 ppm waren niedriger als die der Einzelbehandlungen, so dass die Wahrscheinlichkeit einer auftretenden Mortalität in den Einzelbehandlungen höher war. Bei 8 und 40 ppm Permethrin wurde in den Kompatibilitätsversuchen – auch wenn für beide eine Kompatibilität ermittelt wurde – die Keimrate und das vegetative Wachstum beider Stämme negativ beeinflusst. Dieses könnte das negative Ergebnis der Kombination mit hervorgerufen haben. Dennoch ist es überraschend, da in anderen Studien die Kombination aus entomopathogenem Pilz und Pyrethroiden zu positiven Ergebnissen führten. Bei Kombinationsversuchen von *M. anisopliae* (10^7 und 10^8 Konidien/ml) mit Permethrin in Konzentrationen von 0,025, 0,05 und 0,25 ppm gegen Nymphen von *Ixodes scapularis* konnten additive Interaktionen des Pilzes mit Permethrin gefunden werden (Hornbostel *et al.* 2005). Bei Behandlung eines pyrethroidresistenten Stammes von *R. microplus* mit einer Kombination aus Deltamethrin (Pyrethroid) und

M. anisopliae kam es zu einer erhöhten Mortalität in allen Kombinationsbehandlungen gegenüber den Einzelbehandlungen. Es konnte der LC₅₀-Wert für Deltamethrin von 10,85 (4,55 – 25,88) ppm bei Einzelanwendung auf 0,11 (3,43 x 10⁻² – 2,53) ppm bei Anwendung in Kombination mit 2,2 x 10⁷ Konidien/ml von *M. anisopliae* reduziert werden (Bahense *et al.* 2006). Beim Einsatz von *B. bassiana* (1,0 x 10⁸ Konidien/ml) mit unterschiedlichen Konzentrationen von Deltamethrin (0,25 bis 2500 ppm) gegen die Zecke *Hyalomma [anatolicum] anatolicum* konnte für alle Kombinationsvarianten eine höhere Mortalität und ein früherer Wirkungseintritt erzielt werden (Sun *et al.* 2011).

Keine der Kombinationen mit Imidacloprid verursachte eine höhere Mortalität im Vergleich zu den Kontrollen. Da Imidacloprid keine besonders gute Wirkung auf Zecken hat (Cruthers *et al.* 1999), ist es möglich, dass die Wirkung des Pilzes aufgrund der fehlenden Wirkung von Imidacloprid auf die Larven nicht so verbessert werden konnte wie es durch Fipronil der Fall war. Der Versuch sollte wiederholt werden, um zu überprüfen, ob Imidacloprid tatsächlich keinen Einfluss auf die durch *M. anisopliae* verursachte Mortalität hat. Die Erhöhung der Pilzkonzentration und damit der Larvenmortalität sollte eine deutlichere Aussage bezüglich der Verbesserung der Pilzwirkung durch Imidacloprid bringen. In den Kompatibilitätsversuchen hatte Imidacloprid auf das vegetative Wachstum von MA-7 nicht aber von MA-K einen positiven Einfluss, so dass dieser Effekt auch in den Kombinationen erwartet wurde. In anderen Studien, in denen verschiedene Insekten mit Kombinationen aus Pilz und Imidacloprid behandelt wurden, erzielten diese Kombinationen sogar vielfach synergistische Effekte, was aber hauptsächlich durch von Imidacloprid verursachte Verhaltensänderungen der Zielorganismen zustande kam. Bei Versuchen mit Kombinationen aus *M. anisopliae* oder *B. bassiana* und Imidacloprid zur Bekämpfung der Larven von *Diaprepes abbreviatus* konnten die Pilzinfektionen erhöht werden, da die mit Imidacloprid behandelten Larven die Konidien aufgrund von Immobilität nicht von der Kutikula abstreifen konnten (Quintela und McCoy 1998a). Auch die Beeinflussung des Putzverhaltens durch Imidacloprid, wie es sich in dem Versuch mit *H. tenuis* gezeigt hat, begünstigte eine Infektion durch *M. anisopliae* oder *B. bassiana* und erhöhte die Mortalität in den Kombinationen gegenüber den Mortalitäten in den Einzelbehandlungen (Moino Jr. und Alves 1998). Auch Jaramillo *et al.* (2005) stellten eine Verbesserung der Wirkung auf *Cyrtomenus bergi* von *M. anisopliae* in Kombination mit Imidacloprid aufgrund von Verhaltensänderungen (Verlust der Fähigkeit, die Exuvien abzustreifen und sich tiefer ins Substrat einzugraben).

Für eine eindeutige Bewertung der Effizienz der Kombinationen ist aber ein stabiler Wirkungsgrad des Pilzes unverzichtbar. Dieser war in den vorliegenden Versuchen nicht

gegeben, so dass vor weiteren Kombinationsversuchen zunächst eine höhere Stabilität der Effizienz von MA-7 und MA-K erreicht werden sollte.

4.4.4 Fazit

Grundsätzlich ist die Anwendung der Kombination von MA-7 oder MA-K mit Fipronil gegen Weibchen und Larven von *R. microplus* aufgrund additiver und synergistischer Effekte vielversprechend; dabei sind besonders die Vorteile der Reduktion des Ektoparasitizids und die Beschleunigung des Wirkungseintritts des Pilzes zu nennen. Auch die Anwendung der Kombination aus MA-7 oder MA-K und einer Konzentration von Amitraz, die leicht höher als der ermittelte EC₅₀-Wert ist, kann ein geeignetes Mittel sein, die Eiablage und Schlupfrate von *R. microplus* drastisch zu reduzieren, vorausgesetzt, dass der Pilzstamm nicht negativ beeinflusst wird.

Die Versuche zu Kombinationseffekten von Permethrin und Imidacloprid sollten nach Stabilisierung der Testmethode für Eier und Larven wiederholt werden, um eine Aussage über das Potenzial der Kombinationen treffen zu können. Allerdings sind weitere Studien erforderlich, um die konzentrationsabhängige Veränderung der Effekte von Schädlingsbekämpfungsmitteln auf die Stämme von *M. anisopliae* zu untersuchen und zu stabilisieren und so die Anwendung kombinierter Präparate *in vivo* zu ermöglichen.

Allgemeine Diskussion

Zecken sind Ektoparasiten an vielen Wild- und Nutztieren und befallen auch den Menschen. Der Zeckenstich kann Toxikosen, allergische Antworten bis hin zu (tödlichen) Paralyse verursachen. Zusätzlich begünstigen die Stichwunden Sekundärinfektionen. Zecken sind weltweit die bedeutendsten Vektoren im Veterinärbereich und die zweitbedeutendsten im Humanbereich (Khan 2010, Nicholson *et al.* 2009). Bei Nutztieren haben Zeckenstiche eine Abnahme der Fell- bzw. Lederqualität und damit eine Wertminderung zur Folge (Eckert *et al.* 2008).

Die Kontrolle von Zecken wird in den meisten Fällen mit Ektoparasitiziden vorgenommen. Diese Behandlungen verursachen hohe Kosten, haben Effekte auf Nicht-Zielorganismen, kontaminieren die Umwelt und induzieren Resistenzen (Castro-Janer *et al.* 2010, Moyo und Masika 2009, Schulze *et al.* 2005, Gassner *et al.* 1997, Sonenshine 1993). Deshalb wird angestrebt, die aufgewendete Ektoparasitizidmenge zu minimieren bzw. es nach biologischen Alternativen gesucht. Entomopathogene Pilze sind ein vielversprechendes Mittel zur biologischen Schädlingsbekämpfung. Die Wirkung der entomopathogenen Pilze variiert aber stark, u. a. in Abhängigkeit von den verschiedenen Zeckenspezies (z. B. Kirkland *et al.* 2004a, Kirkland *et al.* 2004b, Leemon und Jonsson 2008, Gindin *et al.* 2002). Es ist notwendig, die Wirksamkeit der entomopathogenen Pilze zu stabilisieren, um die für die Zeckenkontrolle erforderliche Effizienz zu erzielen. Durch die Kombination von entomopathogenen Pilzen und geringen Konzentrationen von Schädlingsbekämpfungsmitteln könnte die Effizienz des Pilzes verbessert und gleichzeitig die Menge an einzusetzenden Schädlingsbekämpfungsmitteln reduziert werden.

Das Ziel dieser Arbeit war, die Möglichkeiten verschiedener Kombinationen aus *M. anisopliae* und Schädlingsbekämpfungsmitteln zu untersuchen. Dazu wurden zwei Stämme von *M. anisopliae* eingesetzt und fünf verschiedene chemische Schädlingsbekämpfungsmittel aus den Klassen der Pyrethroide, Neonikotinoide, Phenylpyrazole, Triazapentadiene sowie der Wachstumsregulatoren und ein pflanzliches Schädlingsbekämpfungsmittel getestet. Es wurden Versuche mit drei Zeckenarten und verschiedenen Entwicklungsstadien durchgeführt: mit ungesogenen Adulten von *R. sanguineus*, mit vollgesogenen Nymphen und ungesogenen Adulten von *A. hebraeum* sowie mit Eiern, ungesogenen Larven und vollgesogenen Weibchen von *R. microplus*.

Vor einer kombinierten Anwendung von Schädlingsbekämpfungsmittel und *M. anisopliae* ist es zunächst erforderlich, die Kompatibilität des Schädlingsbekämpfungsmittels mit dem Pilz zu untersuchen. Außerdem müssen die subletalen Konzentrationen von den

Schädlingsbekämpfungsmitteln und den *M. anisopliae*-Stämmen ermittelt werden, um diese anschließend gemeinsam anzuwenden.

Kompatibilität

Bei einer kombinierten Anwendung von entomopathogenem Pilz und Schädlingsbekämpfungsmitteln müssen immer die potenziellen negativen Einflüsse der Schädlingsbekämpfungsmittel auf die entomopathogenen Pilze betrachtet werden (Moino Jr. und Alves 1998), da eine Effizienzsteigerung des Pilzes durch Schädlingsbekämpfungsmittel nur erzielt werden kann, sofern die eingesetzten Schädlingsbekämpfungsmittel den entomopathogenen Pilz nicht negativ beeinflussen. Das benutzte Testsystem betrachtet den Fall, dass der Pilz während seiner gesamten Entwicklung (von der Keimung bis zur Sporulation) in permanentem Kontakt mit dem Schädlingsbekämpfungsmittel steht, was in Feldversuchen so nicht der Fall sein sollte (Neves *et al.* 2001). Es wird in der Laborprüfung ein „Worst-Case-Szenario“ experimentell gestaltet, um auch geringste Effekte zu erkennen oder unwirksame Mittel sicher zu selektieren. Da das vegetative Wachstum des Pilzes bei Befall *in vivo* im Inneren des Arthropoden geschieht, sollte der Pilz mit dem Schädlingsbekämpfungsmittel nicht dauerhaft in Kontakt kommen bzw. die Konzentration, mit der der Pilz in Kontakt kommt, sollte geringer sein als die Konzentrationen, die in *in vitro* Versuchen getestet werden (da Silva und Neves 2005). Auch der Einfluss auf die Konidienbildung sollte geringer sein als *in vitro*, da das Myzel erst eine Weile nach der Applikation der Kombination auswächst. Alves *et al.* (1998) gehen davon aus, dass bei einer Kompatibilität *in vitro* das Risiko von unerwünschten Effekten unter Freilandbedingungen als ziemlich gering angesehen werden kann.

Die Ergebnisse der Kompatibilitätsversuche ließen den Schluss zu, dass keines der getesteten Schädlingsbekämpfungsmittel die Entwicklung der getesteten *M. anisopliae*-Stämme MA-K und MA-7, und damit die Infektion eines Wirtes, bei kombinierter Anwendung in ausgesuchten Konzentrationen stören sollte. Die Keimung wurde durch höhere Konzentrationen maximal um 15 % gehemmt. Weiterhin wurde das vegetative Wachstum selbst durch die höchsten Konzentrationen der Schädlingsbekämpfungsmittel (außer bei Fipronil) um nicht mehr als 13 % im Vergleich zur Kontrolle eingeschränkt. Einzig die Konidienbildung wurde zum Teil stark negativ beeinflusst. Mit Hilfe des Toxizitätsschemas von Alves *et al.* (1998) ließ sich anhand des vegetativen Wachstums und der Konidienbildung die Kompatibilität klassifizieren. Im Gegensatz zu Versuchen anderer Autoren (z. B. Alizadeh *et al.* 2007, de Oliveira und Neves 2004, Batista Filho *et al.* 2001), in denen es teilweise

erhebliche Beeinträchtigungen gab, waren die getesteten Schädlingsbekämpfungsmittel in der vorliegenden Studie (bis auf zwei Ausnahmen) mit beiden Pilzstämmen kompatibel. Lediglich die höheren Konzentrationen von Fipronil (40 und 200 ppm) und Etoxazol (20 und 100 ppm) mussten in Verbindung mit 1 % DMSO gegenüber einem der getesteten *M. anisopliae*-Stämme (MA-7) als moderat toxisch bzw. toxisch (100 ppm Etoxazol) eingestuft werden.

Das Toxizitätsschema von Alves *et al.* (1998) bezieht die Keimrate nicht mit ein. Diese ist jedoch ein wichtiger Schritt für die Infektion und die Effektivität des Pilzes wird durch deren Hemmung stark beeinträchtigt (Anderson und Roberts 1983). Wird ein überarbeitetes Toxizitätsschema von Alves *et al.* (2007) angewendet, das diesen Parameter mit einbezieht, werden alle betrachteten Konzentrationen als kompatibel eingestuft (Schumacher und Poehling 2012). Diese positiven Bewertungen der verschiedenen Kombinationen erwiesen sich aber in den Kombinationsversuchen an Zecken als unrealistisch. Obwohl z. B. Etoxazol in Konzentrationen bis 4 ppm als kompatibel mit MA-K und MA-7 eingestuft wurde, waren die Effekte aus Kombinationen mit den Pilzen und 0,032 ppm Etoxazol antagonistisch. Die Bewertung mit Hilfe des alten Toxizitätsschemas (Alves *et al.* 1998) ist dabei näher an den Kompatibilitäten, die bei den Kombinationsversuchen an Zecken ermittelt wurden, als die des neuen Toxizitätsschemas (Alves *et al.* 2007). Vielleicht wäre eine Formel, die dem physiologischen Parameter, der am stärksten betroffen ist, die größte Bedeutung beimisst, realistischer, was die Beurteilung für spätere Kombinationsversuche betrifft.

Subletale Konzentrationen der Schädlingsbekämpfungsmittel

Fipronil besitzt eine schnelle Kontakt- und eine langanhaltende Residualwirkung (Blagburn und Lindsay 2001, Postal *et al.* 1995). Es wurde an allen Zeckenstadien und -arten angewendet und lässt somit einen bedingten Vergleich der Empfindlichkeit der einzelnen Arten und Stadien zu. Der LC₅₀-Wert von Fipronil lag nach 14 Tagen für ungesogene Adulte von *R. sanguineus* zwischen 1,14 ppm und 1,55 ppm, ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den Geschlechtern aufzuweisen. Auf die vollgesogenen Nymphen von *A. hebraeum* wirkte Fipronil ebenfalls, allerdings lag der LC₅₀-Wert bei 2,06 ppm Fipronil. Der LC₅₀-Wert nach 14 Tagen für die Adulten von *A. hebraeum* lag mit 5,6 bis 7,5 ppm deutlich höher als der für die Nymphen von *A. hebraeum* oder die Adulten von *R. sanguineus*. Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen von *R. sanguineus* und *A. hebraeum* konnten durch andere Studien nicht bestätigt werden, da dort nicht zwischen den Geschlechtern

unterschieden wurde (z. B. Dryden *et al.* 2006a, Dryden *et al.* 2006b) oder nur die Empfindlichkeit der Weibchen untersucht wurde (z. B. Estrada-Peña und Rème 2005).

Der berechnete EC/LC₅₀-Wert für die verschiedenen Stadien von *R. microplus* nahm von vollgesogenen Weibchen (1,53 ppm), über Eier (0,36 ppm) bis hin zu den Larven (0,26 ppm) ab, wobei Nymphen bei den Untersuchungen nicht berücksichtigt wurden. Die ermittelten Ergebnisse, welche zeigten, dass die Empfindlichkeit der Stadien mit zunehmender Größe (von Larven zu Adulten) für *R. microplus* und *A. hebraeum* abzunehmen scheint, wurde auch für andere Schädlingsbekämpfungsmittel und Zeckenarten ermittelt (Abdel-Shafy und Zayed 2002, Koch und Burkwhat 1984). Über Eier gibt es vergleichsweise wenig Studien zur Empfindlichkeit gegenüber Schädlingsbekämpfungsmitteln. Den Ergebnissen in dieser Studie zufolge reagierten Eier jedoch weniger empfindlich, was auch in anderen Studien beobachtet wurde (Kramer und Nauen 2011, Abdel-Shafy und Zayed 2002, Munthali 1984). Die geringere Wirksamkeit auf die Eier kann dabei entweder über das kleinere Oberflächen-Volumen-Verhältnis der Eier, durch welches weniger Schädlingsbekämpfungsmittel im Verhältnis zur Masse an die Eier gelangt, oder mit der schlechten Permeabilität der Eischutzhülle (Lees und Beament 1948) erklärt werden.

Ein weiteres getestetes Schädlingsbekämpfungsmittel, Etoxazol, ist aufgrund des Wirkmechanismus (Hemmung des Häutungsprozess [Nauen und Smagghe 2006, Suzuki *et al.* 2001]) nur für die Kontrolle von vollgesogenen Stadien, die sich häuten müssen, geeignet und wurde in den vorliegenden Versuchen nur an vollgesogenen Nymphen von *A. hebraeum* getestet. Etoxazol verhinderte bereits in sehr niedrigen Konzentrationen den Schlupf zur Adulten und führte bei 0,032 ppm zu einer 50 %igen und bei 0,16 ppm sogar zu einer 100 %igen Mortalität. Ein ähnliches Ergebnis konnten Tamura *et al.* (2004) gegen vollgesogene Nymphen von *H. longicornis* erzielen.

Amitraz, Permethrin, Imidacloprid und NeemAzal wurden aufgrund der zur Verfügung stehenden Zecken nur an *R. microplus* getestet, wobei die Wirksamkeit von Amitraz an allen drei Entwicklungsstadien, die von Permethrin, Imidacloprid und NeemAzal nur an ungesogenen Larven und Eiern ermittelt wurde.

Amitraz besitzt eine hohe Effektivität gegen Ektoparasiten (u. a. Läuse, Milben, Zecken) und verfügt über eine repellente Wirkung (Ungemach 2010, Gupta 2007). Es wurde in die vorliegende Studie mit einbezogen, um für das Trilaterale Projekt Deutschland-Israel-Palästina auch einen in Israel relevanten Wirkstoff zu testen, da Fipronil zur Anwendung an Rindern in Israel nicht zugelassen ist (Samish, persönliche Mitteilung).

Amitraz wirkte gegen *R. microplus* schwächer als Fipronil, da für alle Stadien ein höherer LC₅₀-Wert ermittelt wurde als für Fipronil. Der Wert für die Weibchen (7,13 ppm) lag aber in einem ähnlichen Bereich, wie er auch für andere empfindliche Stämme beschrieben wurde (Jonsson *et al.* 2007, Oliveira *et al.* 2000). Die Larven (LC₅₀-Wert von 0,17 ppm) schienen, verglichen mit LC₅₀-Werten (~ 15 ppm bis 240 ppm) anderer Autoren (Barré *et al.* 2008, Davey *et al.* 2008, Ducornez *et al.* 2005), sehr empfindlich auf Amitraz zu reagieren. Der LC₅₀-Wert der Eier wurde mit 0,66 ppm berechnet. Es konnten keine Vergleichsstudien, die die Empfindlichkeit von direkt mit Amitraz behandelten Eiern untersuchten, gefunden werden. Die erhöhte Wirksamkeit von Amitraz auf Larven im Gegensatz zu den Eiern könnte aber, wie bei Fipronil, entweder durch das ungünstigere Oberflächen-Volumen-Verhältnis der Eier oder mit der schlechten Permeabilität der Eischutzhülle aufgrund der starken Wachsschicht (Lees und Beament 1948) erklärt werden.

Permethrin hat ein breites Anwendungsgebiet (Blagburn und Lindsay 2001) und besitzt neben der abtötenden auch eine repellente Wirkung (Endris *et al.* 2000, Kočišová und Para 1999). Allerdings gibt es bereits einige resistente Zeckenstämme (z. B. Li *et al.* 2007, Miller *et al.* 1999). Für die Larven wurde 14 Tage nach der Behandlung ein LC₅₀-Wert von ~ 179 ppm ermittelt. Andere Untersuchung fanden für Larven empfindlicher *R. microplus*-Stämme, die mittels eines Kontakttests getestet wurden, nach 48 Stunden ähnliche LC₅₀-Werte (Li *et al.* 2008, Miller *et al.* 1999). In der vorliegenden Studie töteten 1000 ppm nur 75 % der Larven 14 Tage nach der Behandlung und erst nach einer Behandlung mit 5000 ppm starben 94 % der Larven im Versuchszeitraum. Fernandes (2001) fand 24 Stunden nach der Behandlung mit 1250 ppm bzw. 2500 ppm Permethrin eine Mortalitätsrate der Larven von 86,2 bzw. 100 %, trotz vorliegender leichter Cypermethrin- und Deltamethrinresistenz.

Es ist anzunehmen, dass der in den vorliegenden Versuchen getestete *R. microplus*-Stamm eine (leichte) Resistenz gegenüber Permethrin aufweist, was auch durch die Ergebnisse der Eierbehandlungen bestätigt wird. Eine 85 %ige Schlupfinhibition sieben Tage alter Eier konnte erst mit einer Konzentration von 1000 ppm erreicht werden, während Davey (1995) nach topikaler Applikation von 1000 ppm Permethrin auf zehn Tage alte Eier eine 94,1 %ige Schlupfinhibition erzielte. Dass die Eier im Vergleich mit den Larven gegenüber Permethrin empfindlicher reagieren, steht im Gegensatz zu den Beobachtungen, die nach Behandlung mit den anderen Schädlingsbekämpfungsmitteln gemacht wurden. Diese höhere Empfindlichkeit könnte entweder aufgrund der hohen Lipophilie von Permethrin (Bromilow *et al.* 2003) und damit der besseren Durchdringung der Wachsschicht der Eier erklärt werden oder aber durch

den Mechanismus der Resistenz (Pruett *et al.* 2002, Miller *et al.* 1999), der bei den Eiern evtl. noch nicht (in ausreichendem Maße) vorhanden ist.

Imidacloprid immobilisiert die Zielorganismen nach Anwendung schnell („Knock-down-Effekt“) (Ungemach 2010). Die Effizienz von Imidacloprid gegen Zecken ist allerdings schlechter als die des Fipronilpräparates, das als Vergleichsmittel genutzt wurde (Cruthers *et al.* 1999). Daher sind die hohen Konzentrationen, die zur Kontrolle der Larven (> 200 ppm) und den weniger empfindlichen Eiern (> 5000 ppm) benötigt werden, nicht überraschend. Dennoch wurde Imidacloprid für die Kombinationsstudien ausgewählt, da in verschiedenen Untersuchungen eine verbesserte Wirkung von entomopathogenen Pilzen in Verbindung mit Imidacloprid nachgewiesen wurde (u. a. Jaramillo *et al.* 2005, Quintela und McCoy 1998b).

NeemAzal gehört zu den pflanzlichen Pestiziden. Die Extrakte aus den Samen des Neem-Baums enthalten u. a. die aktive Komponente Azadirachtin, welche insektizide, fungizide und bakterizide Eigenschaften aufweist (Ware und Whitacre 2004). Die Eier von *R. microplus* reagierten deutlich weniger empfindlich auf NeemAzal als die Larven, deren berechneter LC₅₀-Wert mit ~ 2500 ppm allerdings auch verhältnismäßig hoch war. Auch für andere Zeckenarten sind ähnlich hohe Konzentrationen erforderlich, um Effekte zu erzielen (Al-Rajhy *et al.* 2003, Abdel-Shafy und Zayed 2002). Aufgrund der schlechten Löslichkeit von mehr als 1000 ppm NeemAzal in *Aq. dest.* mit 1 % DMSO und der nicht getesteten Kompatibilität der *M. anisopliae*-Stämme mit so hohen NeemAzal-Konzentrationen konnten keine Kombinationsversuche mit NeemAzal durchgeführt werden.

Konzentrationen von MA-K und MA-7 mit geringem Wirkungsgrad

Die beiden getesteten Stämme von *M. anisopliae* wurden bereits in anderen Studien erfolgreich gegen verschiedene Stadien von beispielsweise *R. sanguines* oder *R. annulatus* angewendet (Gindin *et al.* 2009, Gindin *et al.* 2002, Gindin *et al.* 2001, Samish *et al.* 2001), weshalb sie für die vorliegende Studie ausgewählt wurden.

Ungesogene Adulte von *R. sanguineus* wiesen eine hohe Sensitivität gegenüber beiden *M. anisopliae*-Stämmen auf. Es konnten LC₅₀-Werte zwischen $1,77 \times 10^4$ und $5,14 \times 10^4$ Konidien/ml für beide Geschlechter nach 28 Tagen Inkubation ermittelt werden. Ähnliche LC₅₀-Werte wurden für beide *M. anisopliae*-Stämme für die vollgesogenen Nymphen von *A. hebraeum* ($1,54 - 1,67 \times 10^4$ Konidien/ml) gefunden. Die LC₅₀-Werte der ungesogenen Adulten von *A. hebraeum* (je nach Stamm zwischen $1,0 \times 10^6$ und $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml) waren deutlich höher als die Werte für Adulte von *R. sanguineus* und Nymphen von *A. hebraeum*, wobei Weibchen von *A. hebraeum* weniger empfindlich reagierten als

Männchen. Für vollgesogene Weibchen von *R. microplus* wurden LC₅₀-Werte von 1,1 – 2,56 x 10⁶ Konidien/ml berechnet. Die abgelegte Eimenge und die Schlupfrate nahmen konzentrationsabhängig ab, wobei die Reduktion der Eimenge in der vorliegenden Studie einzig durch die getöteten Weibchen bedingt war. Die Eiablagekapazitäten der Weibchen, die im Versuchszeitraum nicht starben, wurden durch die Behandlung mit MA-K oder MA-7 nicht beeinträchtigt, obwohl MA-7 in einer anderen Studie die Menge der abgelegten Eier reduzieren konnte (Gindin *et al.* 2001). Die Schlupfrate wurde im Vergleich zu der in der Kontrolle aber, unabhängig von dem Vitalstatus des Weibchens, vermindert. Für direkt behandelte Eier konnten LC₅₀-Werte von 3,72 x 10⁴ Konidien/ml (MA-7) bzw. 7,87 x 10⁶ Konidien/ml (MA-K) berechnet werden. Auch für die Larven ergaben sich ähnliche LC₅₀-Werte (5,39 x 10⁴ - 8,32 x 10⁶ Konidien/ml), wobei keine signifikanten Wirkungsunterschiede zwischen den Pilzstämmen vorlagen, weshalb die Wirksamkeit als gleichartig eingestuft wurde.

Interessant ist, dass der Pilz, auch wenn er den Schlupf der Nymphe von *A. hebraeum* zur Adulten nicht verhindern konnte, innerhalb von wenigen Tagen nach dem Schlupf die Adulten abtötete. Ähnliches wurde über MA-7 und andere *M. anisopliae*-Stämme in Bezug auf frischgeschlüpfte Adulte von *R. sanguineus* berichtet (Samish *et al.* 2001). Auch bei Eiern von *R. microplus* gab es Pilzinfektionen, die nicht durch neu gebildete Konidien (im Englischen „secondary cycling“) auf den toten Weibchen verursacht werden konnten, da die Weibchen bis zum Versuchsende nicht an einer Pilzinfektion starben. Die Eier konnten sich entweder sekundär mit den Konidien aus der Tauchbehandlung von der Kutikula der Weibchen (horizontal – im Englischen: „secondary pick-up“) oder evtl. noch im Weibchen (vertikal) infiziert haben (Kaaya und Okech 1990), wodurch die konzentrationsabhängig ansteigende Eimortalität in Ansätzen mit noch lebenden Weibchen zu erklären wäre.

In anderen Studien wurde eine Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber entomopathogenen Pilzen von Stadium zu Stadium beobachtet (Kirkland *et al.* 2004a, Kirkland *et al.* 2004b, Gindin *et al.* 2002, Gindin *et al.* 2001, Samish *et al.* 2001, Kaaya und Hassan 2000). Allerdings ist die Zuordnung der Empfindlichkeit für direkt behandelte Eier nicht eindeutig. Einige Studien mit Eiern und ungesogenen Larven von *R. annulatus* oder *R. microplus* ermittelten isolatsabhängig ähnliche Empfindlichkeiten (Fernandes *et al.* 2004, Gindin *et al.* 2002), während in anderen Studien eine geringere Sensitivität der Eier festgestellt wurde (Fernandes *et al.* 2004, Gindin *et al.* 2001, Souza *et al.* 1999). Diese Ergebnisse konnten bedingt auch in den vorliegenden Studien beobachtet werden. Während die Nymphen von *A. hebraeum* empfindlicher reagierten als die Adulten, hatte MA-K für alle Stadien von

R. microplus ein ähnliches Wirkspektrum. Weibchen und Larven reagierten auch ähnlich auf MA-7, Eier reagierten jedoch empfindlicher.

Da vollgesogene Stadien empfindlicher auf entomopathogene Pilze reagieren als ungesogene Stadien (Samish *et al.* 2001, Reis *et al.* 2001), würde das die ähnliche Empfindlichkeit von Larven und Weibchen von *R. microplus* erklären.

Hinsichtlich der Empfindlichkeit gegenüber den beiden Pilzstämmen gab es bis auf eine Ausnahme keine Unterschiede zwischen den Geschlechtern von *R. sanguineus*. Allerdings waren die Adulten von *A. hebraeum* unterschiedlich empfindlich gegenüber den höheren Konidien-Konzentrationen von MA-K. In der Literatur finden sich Hinweise, dass Männchen (tendenziell) empfindlicher als Weibchen auf bestimmte Stämme von *M. anisopliae* reagieren können (Gindin *et al.* 2002, Samish *et al.* 2001). Allerdings gab es zwischen den Geschlechtern nach Behandlung mit anderen Pilzstämmen von *M. anisopliae* keine Unterschiede (Kirkland *et al.* 2004b, Reis *et al.* 2001, Samish *et al.* 2001). Bemerkenswert ist auch, dass die Empfindlichkeit der einzelnen Arten sehr unterschiedlich war. So waren vollgesogene Nymphen von *A. hebraeum* am empfindlichsten, gefolgt von ungesogenen Adulten von *R. sanguineus*, Eiern, Larven und Adulten von *R. microplus* und Adulten von *A. hebraeum*. Auch wenn die Versuche aufgrund von unterschiedlichen Pilzchargen nur bedingt miteinander vergleichbar sind, ergibt sich die Tendenz, die auch andere Studien bestätigen, dass unterschiedliche Zeckenarten unterschiedlich empfindlich auf *M. anisopliae* reagieren (Kirkland *et al.* 2004a, Kirkland *et al.* 2004b, Gindin *et al.* 2002, Kaaya und Hassan 2000). Es lässt sich also folgern, dass sowohl die Zeckenart als auch das Entwicklungsstadium eine ebenso wichtige Rolle bei der Bestimmung der Wirksamkeit eines entomopathogenen Pilzstammes spielen wie der Pilzstamm selbst.

Als kritisch einzustufen ist die Zeitspanne, die erforderlich war, bis für die untersuchten *M. anisopliae*-Stämme in den vorliegenden Versuchen eine erkennbare Infektion und schließlich der Tod der Zecken eintrat, auch wenn vergleichbare Stämme ähnliche Inkubationszeiten benötigten (z. B. Kirkland *et al.* 2004b, Samish *et al.* 2001). Wird davon ausgegangen, dass eine spätere Anwendung von *M. anisopliae* am Wirt der Zecken erfolgen soll, haben sowohl die Adulten von *A. hebraeum* und *R. sanguineus*, deren Saugakt zwischen 6 und 19 Tage dauert (Bechara *et al.* 1995, Pegram *et al.* 1987, Nutall 1915) als auch die Larven von *R. microplus*, die zwischen 3,5 und 9,5 Tage am Wirt saugen (Nuñez *et al.* 1985) genügend Zeit sich voll zu saugen und Krankheitserreger zu übertragen, ehe eine Infektion durch *M. anisopliae* und damit eine Verringerung der Saugaktivität der Zecke und des Übertragungsrisikos eintritt. Auch wenn durch eine Erhöhung der Konidien-Konzentration die

Infektion beschleunigt wird, reicht diese nicht aus um das Festsaugen am Wirt zu verhindern. Gleichzeitig nimmt mit einer Erhöhung der Konzentration von *M. anisopliae* das Risiko zu, dass auch Nicht-Zielorganismen infiziert werden. Ein kombinierter Einsatz von Schädlingsbekämpfungsmitteln und *M. anisopliae* wurde in dieser Arbeit als Ansatz zur Stabilisierung der Wirkung der Pilze gesehen. Diese Hypothese basiert auf anderen Studien, in denen beobachtet wurde, dass Schädlingsbekämpfungsmittel die Abwehr der Zielorganismen herabsetzen (Hiromori und Nishigaki 2001, Hassan und Charnley 1989) oder das Verhalten beeinflussen (Moino Jr. und Alves 1998, Quintela und McCoy 1998a). Dieses führt zu einer begünstigten bzw. beschleunigten Infektion. In solchen Kombinationen sollten sowohl Pilz als auch Schädlingsbekämpfungsmittel in Konzentrationen eingesetzt werden, in denen sie Nicht-Zielorganismen nicht schaden.

Versuche zu Kombinationen mit MA-K oder MA-7 und Schädlingsbekämpfungsmitteln

In den Versuchen mit *M. anisopliae* (allein und in Kombination) gab es zum Teil eine hohe Variabilität der Wirkeffizienz. Diese Variabilität war besonders prägnant, wenn die Versuche zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt wurden, also mit Konidien, die von Pilzen aus unterschiedlichen Petrischalen geerntet worden waren. Des Weiteren wurde die Wirksamkeit der Pilze aber auch durch unterschiedliche Wirtschargen beeinflusst. Durch diese Variabilität ist der direkte Vergleich zeitlich weiter auseinanderliegender Versuche schwierig und nur bedingt verlässlich. Für verlässliche Vergleiche der unterschiedlichen Zeckenarten und -stadien müssten die Versuche zum gleichen Zeitpunkt mit derselben standardisierten Pilzsuspension (bezüglich des Nährmediums, des Alters der Pilze und des Zeitpunktes der letzten Passage durch einen Zielorganismus) durchgeführt werden. Dieses war in den vorliegenden Versuchen aufgrund der eingeschränkten Planbarkeit der Zeckenlieferungen und der zur Verfügung stehenden Zeckenmenge nicht immer möglich.

In vielen Kombinationsversuchen wirkten die Einzelbehandlungen von MA-K und MA-7 schlechter als es durch die Dosis-Wirkungs-Versuche zuvor ermittelt worden war. Diese neuen Werte stehen zum Teil aber besser in Übereinstimmung mit Daten aus anderen Studien (Kirkland *et al.* 2004b, Gindin *et al.* 2002, Samish *et al.* 2001). Dieses lässt auf eine höhere Variabilität der Virulenz der Konidien von *M. anisopliae* schließen.

Sofern die Kombinationen Mortalitäten über dem Kontrollniveau verursachten, konnten die Kombinationen von *M. anisopliae* und Fipronil bei Anwendung gegen ungesogene Adulte von *R. sanguineus* als additiv eingestuft werden. Die Mortalität setzte bei den Männchen und zum Teil auch bei den Weibchen in diesen Kombinationsbehandlungen früher ein als in den

Einzelbehandlungen von MA-K und MA-7. Für die vorliegende teilweise unterschiedliche Empfindlichkeit der Geschlechter von *R. sanguineus* gibt es keine offenkundige Erklärung. Auch in anderen Studien gab es Unterschiede zwischen den Geschlechtern (Gindin *et al.* 2002, Samish *et al.* 2001), allerdings überrascht es, dass bei den Versuchen zur Ermittlung einer Konzentration mit geringem Wirkungsgrad keine Unterschiede gefunden wurden. Auch dieses lässt auf eine gewisse Variabilität des Pilzes schließen. Natürlich kann auch die unterschiedliche Vitalität der Zecken ein Grund für die Variabilität sein. So ist z. B. die Gewichtszunahme der Zecken von der Eignung des Wirtes abhängig (Latif 1984, Randolph 1979). Die „Qualität“ des blutspendenden Wirtstieres ist ein möglicher Einfluss, der in diesen Versuchen nicht berücksichtigt werden konnte.

Behandlungen der vollgesogenen Nymphen von *A. hebraeum* mit Kombinationen aus Fipronil und *M. anisopliae* hatten überwiegend weder positive noch negative Effekte auf die Mortalität. Einzig $1,0 \times 10^4$ Konidien/ml MA-7 in Kombination mit 1,6 ppm Fipronil hatte einen additiven Effekt auf die Mortalität. Bei den Adulten von *A. hebraeum* verursachten vier der Kombinationen aus MA-K/MA-7 und Fipronil synergistische und drei additive Effekte, während bei allen anderen getesteten Kombinationen kein Effekt ermittelt werden konnte.

Bei Behandlung der Weibchen von *R. microplus* verursachte jeweils eine Kombination aus MA-K ($1,0 \times 10^6$ Konidien/ml und 0,064 ppm) oder MA-7 ($1,0 \times 10^8$ Konidien/ml und 0,32 ppm) und Fipronil geringere Mortalitäten als in den Einzelbehandlungen (antagonistischer Effekt), während alle anderen Kombinationen als additiv eingestuft werden konnten. Auch bei den Kombinationsbehandlungen war die mit zunehmender Konidienkonzentration abnehmende Eimenge einzig den vor Beendigung der Eiablage abgestorbenen Weibchen zuzuschreiben. Es konnten keine subletalen Effekte der Kombinationen auf die abgelegte Eimenge von lebenden Weibchen gefunden werden. Die Schlupfrate war aber in jeder Behandlung mit *M. anisopliae* geringer als in den Kontrollen und den Fipronil-Behandlungen. Dieser Effekt kann auf die Fähigkeit von *M. anisopliae* zurückgeführt werden, sekundäre Infektionen hervorzurufen (Thomas *et al.* 1995, Kaaya und Okech 1990).

Die Mortalität in den Versuchen mit ungesogenen Larven von *R. microplus* war in den Kontrollen sehr hoch (20 – 30 %). Allerdings unterlag sie in den einzelnen Wiederholungen starken Schwankungen (Standardabweichung, die größer als der Mittelwert war). Es ist daher davon auszugehen, dass dieses Testsystem nicht so stabil war, wie es für verlässliche Aussagen erforderlich wäre. Des Weiteren war die Mortalität, die durch die Pilzstämme allein verursacht wurde, innerhalb des sehr langen Versuchszeitraums von 42 Tagen recht gering (maximal bei 20 %) und befand sich damit auf dem Niveau der Kontrolle. Dennoch wirkten

zwei der getesteten Kombinationen ($1,0 \times 10^5$ und $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K in Kombination mit 0,064 ppm) synergistisch.

Die niedrige Mortalität, die allein durch die Pilze verursacht wurde, ist ein Grund dafür, dass es nicht möglich war, eine eindeutig negative oder positive Interaktion von Amitraz, Permethrin oder Imidacloprid mit den Pilzstämmen nachzuweisen. Nach Stabilisierung des Testsystems sollten diese Versuche wiederholt werden, um eine zuverlässige Aussage zur Interaktion von Amitraz, Permethrin oder Imidacloprid mit *M. anisopliae* zu ermöglichen.

Es konnten auch keine aussagekräftigen Ergebnisse in den Versuchen mit direkt behandelten Eiern von *R. microplus* erzielt werden, was auf die Methodik zurückzuführen ist. Auch hier war die Wirkung des Pilzes allein deutlich zu niedrig (Schlupfraten von über 50 %) und die Schlupfraten in den Kontrollen unterlagen starken Schwankungen. Um eine vernünftige Aussage über die Zusammenwirkung von MA-K oder MA-7 und den Schädlingsbekämpfungsmitteln treffen zu können, müssten diese Versuche wiederholt werden. Hierbei ist es jedoch erforderlich die Methodik zu optimieren, um in den Kontrollen eine stabil hohe Schlupfrate zu erzielen.

Bei der Kontrolle von vollgesogenen Weibchen von *R. microplus* erwies sich eine Kombination von MA-K und Amitraz ($1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-K und 1,6 ppm) wegen ihrer antagonistischen Effekte als ungeeignet. Die Kombinationen aus $1,0 \times 10^6$ Konidien/ml MA-7 mit 0,32 oder 1,6 ppm Amitraz verursachten hingegen deutlich höhere Mortalitäten als die Einzelbehandlungen und konnten als synergistisch eingestuft werden. Die anderen Kombinationen erwiesen sich als additiv. Dass Amitraz die Eiablage inhibiert, zeigte sich nicht nur in den Ergebnissen anderer Studien (Ribeiro *et al.* 2010, Oliveira *et al.* 2000), sondern auch bei den Behandlungen mit 1,6 ppm allein und in Kombination mit den beiden Pilzstämmen. Ebenso, wie in den Kombinationsbehandlungen mit Fipronil, wurde die Schlupfrate durch die Fähigkeit des Pilzes, Sekundärinfektionen hervorzurufen (Kaaya und Okech 1990), konzentrationsabhängig stark reduziert. Bei einem antagonistischen Effekt war nicht nur die Mortalität in der Kombinationsbehandlung geringer, sondern auch die durch Amitraz verursachte Eiablageinhibition wurde abgeschwächt, was darauf schließen lässt, dass beide Komponenten der Kombination sich gegenseitig negativ beeinflussen. Die Schlupfinhibition durch den Pilz wurde davon nicht betroffen, was ein weiteres Indiz für eine von der Kombination abgekoppelte Wirkung des Pilzes wäre. Vergleichsstudien mit Amitraz konnten nicht gefunden werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass andere Autoren nur negative Ergebnisse zur Kompatibilität von Amitraz und entomopathogenen Pilzen erzielten (Alizadeh *et al.* 2007, de Oliveira und Neves 2004). Da Amitraz der einzige Vertreter seiner

Wirkklasse ist, konnten auch keine Studien mit verwandten Wirkstoffen zum Vergleich herangezogen werden.

Bei Behandlung vollgesogener Nymphen von *A. hebraeum* mit Kombinationen aus *M. anisopliae* und 0,0064 ppm Etoxazol wurden additive Effekte gefunden. Die Kombinationen mit der höheren Etoxazol-Konzentration waren antagonistisch, sofern die Kontrollmortalitäten übertroffen wurden.

In vielen Fällen wurde *M. anisopliae* durch Zugabe von Schädlingsbekämpfungsmitteln eher negativ beeinflusst. Im Gegensatz zu dem Kompatibilitätstest, in dem nur definiertes Medium mit einer optimalen Zusammensetzung benutzt wurde, gibt es auf der Kutikula verschiedene Stoffe, die die Entwicklung des Pilzes beeinflussen (Ment *et al.* 2010, Szafranek *et al.* 2001, Bidochka und Khachatourians 1992). Dadurch wäre es möglich, dass die Konidien auf die Schädlingsbekämpfungsmittel empfindlicher reagiert haben als es in den Kompatibilitätsversuchen der Fall war und der Anteil beschädigter Konidien daher so hoch war, dass keine Infektion mehr ausgelöst werden konnte. Wenn aber genügend lebensfähige Konidien verbleiben, was bei einer höheren Ausgangskonzentration, z. B. $1,0 \times 10^7$ oder $1,0 \times 10^8$ Konidien/ml wahrscheinlicher ist, kann eine höhere Konzentration von Schädlingsbekämpfungsmittel in der Kombination eine bessere Mortalität erzielen, da die höhere Konzentration einen erhöhten Stresseffekt auf die Zecke ausübt.

Die Schlupfraten der Eier von behandelten Weibchen von *R. microplus* waren nach Behandlungen mit MA-7 geringer als nach Behandlung mit MA-K. Auch bei vollgesogenen Nymphen von *A. hebraeum* starben mehr frischgeschlüpfte Adulte durch MA-7 als durch MA-K. Der Stamm MA-7 scheint also ein höheres Potenzial für Sekundärinfektionen zu haben als MA-K und damit das Potenzial, auch andere als das ursprünglich behandelte Stadium zu bekämpfen. Allerdings war MA-7 bei den Kompatibilitätstests gegenüber den Schädlingsbekämpfungsmitteln empfindlicher.

Obwohl einige Autoren davon ausgehen, dass die Auswirkungen auf den Pilz bei einer kombinierten Anwendung am Wirt geringer sein sollte als in dem *in vitro* Testsystem zur Bestimmung der Kompatibilität (Neves *et al.* 2001, Alves *et al.* 1998), traten (in allen Versuchen) die Ergebnisse, die aufgrund der Kompatibilitätstests erwartet wurden, bei dem kombinierten Einsatz der Schädlingsbekämpfungsmittel mit den beiden Pilzen nur teilweise auf. Mietkiewski *et al.* (1997) fanden Unterschiede zwischen *in vivo*- und *in vitro*-Versuchen bezüglich der Effizienz von entomopathogenen Pilzen in Zusammenhang mit verschiedenen Schädlingsbekämpfungsmitteln. Mögliche Ursachen könnten beim Vergleich von *in vivo*- und *in vitro*- Studien die variablen mikroklimatischen Bedingungen sein und die Konzentrations-

unterschiede der angewendeten Schädlingsbekämpfungsmittel. Diese Faktoren können allerdings in der vorliegenden Studie keine Rolle gespielt haben. Bei einem kombinierten Einsatz von Schädlingsbekämpfungsmittel und *M. anisopliae* an Zecken *in vitro* werden zwar die Umweltbedingungen konstant gehalten, es kommen jedoch Faktoren (z. B. die Kutikulabeschaffenheit) hinzu, die bei den Kompatibilitätstests nicht berücksichtigt werden, aber die Wirkung des Pilzes beeinflussen (Ment *et al.* 2010). Deshalb sollten die Ergebnisse des Kompatibilitätstests nur als Ausschlusskriterium für grundsätzlich ungeeignete Substanzen genutzt werden. Da unterschiedliche Pilzstämme verschiedene Eigenschaften besitzen und somit entsprechend anders auf Schädlingsbekämpfungsmittel reagieren können (Olmert und Kenneth 1974), sollten die Ergebnisse für einen entomopathogenen Pilzstamm nicht oder nur bedingt generalisiert werden. Deshalb müssen für jeden Pilzstamm eigene Tests durchgeführt werden. Die hohe Variabilität der Wirkeffizienz der Pilze macht eine verlässliche Aussage zur Kompatibilität schwierig. Das Wachstum auf zwei zu unterschiedlichen Zeitpunkten angesetzten Medien kann unter Umständen ebenso wie das Alter der Konidien einen Einfluss auf die Virulenz der Pilze haben (Schumacher, unveröffentlicht). Es sollten also die Versuchsbedingungen noch weiter standardisiert/stabilisiert werden, um verlässlichere Aussagen treffen zu können.

Fazit

Aufgrund der gefundenen additiven und synergistischen Effekte von *M. anisopliae* und Fipronil ist es möglich, den Wirkstoff mit dem Pilz zusammen gegen *R. sanguineus*, *A. hebraeum* sowie Weibchen und Larven von *R. microplus* anzuwenden, um durch Herabsetzen der Immunantwort durch Fipronil die Pathogenität des Pilzes zu erhöhen. Vorausgesetzt ist eine ausreichend hohe Konidien-Konzentration, um ausreichend vitale Konidien zu haben. Auf diese Weise ist es möglich, den Wirkbeginn von *M. anisopliae* zu beschleunigen, das sekundäre Verbreitungspotenzial von *M. anisopliae* zu nutzen und die aufgewendete Menge von Fipronil zu minimieren.

Auch die Anwendung der Kombination aus MA-7 oder MA-K und einer Konzentration von Amitraz, die leicht höher als der ermittelte EC₅₀-Wert ist, wäre ein geeignetes Mittel, die Eiablage (durch Amitraz) und Schlupfrate (durch *M. anisopliae*) von *R. microplus* zu reduzieren, vorausgesetzt, es wird eine hohe Konzentration des Pilzes eingesetzt, um negative Effekte von Amitraz zu kompensieren.

Eine kombinierte Anwendung von Etoxazol mit niedrigen Konzentrationen von *M. anisopliae* gegen vollgesogene Nymphen von *A. hebraeum* ist auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse

nur eingeschränkt erfolgsversprechend. Die Ergebnisse für Permethrin und Imidacloprid sollten nach Optimierung der Testmethode für Eier und Larven wiederholt werden, um eine fundierte Aussage über das Potenzial der Kombinationen treffen zu können.

Grundsätzlich sind weitere Studien notwendig, um die konzentrationsabhängige Veränderung der Effekte von Schädlingsbekämpfungsmitteln auf MA-K und MA-7 zu untersuchen und die Wirkung hinreichend zu stabilisieren und so eine Anwendung der kombinierten Präparate *in vivo* zu ermöglichen. Da Schädlingsbekämpfungsmittel nicht dafür geeignet sind, die Empfindlichkeit der entomopathogenen Pilze gegenüber Umwelteinflüssen (UV-Licht, hohe Temperaturen) zu reduzieren, sollte auch nach Alternativen zur Optimierung der Pilzwirksamkeit gesucht werden (z. B. kombinierte Anwendung mit Silikaten, Entwicklung einer Formulierung), um dann gegebenenfalls ganz auf chemische Schädlingsbekämpfungsmittel bei der Kontrolle von Zecken verzichten zu können. Die im Vordergrund stehende Optimierung der Wirksamkeit von *M. anisopliae* konnte mit den vorliegenden Versuchen nicht verlässlich nachgewiesen werden; die kombinierten Anwendungen sind aber dazu geeignet, die Aufwandmenge der Schädlingsbekämpfungsmittel zu reduzieren.

Anhang**Die χ^2 -Verteilung**aus Köhler *et al.* (2002) - 5 % entspricht dem 0,95 Quantil

df	5 %	1 %	0,1 %
1	3,84	6,63	10,83
2	5,99	9,21	13,82
3	7,81	11,34	16,27
4	9,49	13,28	18,47
5	11,07	15,09	20,52
6	12,59	16,81	22,46
7	14,07	18,48	24,32
8	15,51	20,09	26,13
9	16,92	21,67	27,88
10	18,31	23,21	29,59
11	19,68	24,73	31,26
12	21,03	26,22	32,91
13	22,36	27,69	34,53
14	23,68	29,14	36,12
15	25,00	30,58	37,70
16	26,30	32,00	39,25
17	27,59	33,41	40,79
18	28,87	34,81	42,31
19	30,14	36,19	43,82
20	31,41	37,57	45,31
21	32,67	38,93	46,80
22	33,92	40,29	48,27
23	35,17	41,64	49,73
24	36,42	42,98	51,18
25	37,65	44,31	52,62
26	38,89	45,64	54,05
27	40,11	46,96	55,48
28	41,34	48,28	56,89
29	42,56	49,59	58,30
30	43,77	50,89	59,70
40	55,76	63,69	73,40
50	67,50	76,15	86,66
60	79,08	88,38	99,61
70	90,53	100,42	112,32
80	101,88	112,33	124,84
90	113,15	124,12	137,21
100	124,34	135,81	149,45

Literaturverzeichnis

- Abbink J. (1991). The biochemistry of imidacloprid. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 44:183-194.
- Abdel-Shafy S., Zayed A.A. (2002). *In vitro* acaricidal effect of plant extract of neem seed oil (*Azadirachta indica*) on egg, immature, and adult stages of *Hyalomma anatolicum excavatum* (Ixodoidea: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 106(1):89-96.
- Aguda R.M., Rombach M.C., Shepard B.M. (1986). Effect of neem oil on germination and sporulation of the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. *International Rice Research Notes* 11(4):34-35.
- Aguirre D.H., Viñabal A.E., Salatin A.O., Cafrune M.M., Volpogni M.M., Mangold A.J., Guglielmone A.A. (2000). Susceptibility to two pyrethroids in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) populations of northwest Argentina: Preliminary results. *Veterinary Parasitology* 88(3-4):329-334.
- Alizadeh A., Samih M.A., Khezri M., Riseh R.S. (2007). Compatibility of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. with several pesticides. *International Journal of Agriculture and Biology* 9(1):31-34.
- Alonso-Díaz M.A., Rodríguez-Vivas R.I., Fragoso-Sánchez H., Rosario-Cruz R. (2006). Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Archivos de medicina veterinaria* 38(2):105-113.
- Al-Rajhy D.H., Alahmed A.M., Hussein H.I., Kheir S.M. (2003). Acaricidal effects of cardiac glycosides, azadirachtin and neem oil against the camel tick, *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae). *Pest Management Science* 59(11):1250-1254.
- Alvarado R.U., Gonzales J.C. (1979). A postura e a viabilidade do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina: Ixodidae) em condições de laboratório. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 21:31-36.
- Alves S.B. (1998). Fungos entomopatogênicos. In: Alves S.B. (Hrsg.). Controle microbiano de insetos: 289-382. FEALQ, Piracicaba.
- Alves S.B., Haddad M.L., Faion M., de Baptista G.C., Rossi-Zalaf L.S. (2007). Novo índice biológico para classificação da toxicidade de agrotóxicos para fungos entomopatogênicos. Anais do X Simpósio de Controle Biológico - Siconbiol, Brasília.
- Alves S.B., Moino Jr. A., Almeida J.E.M. (1998). Produtos fitossanitários e entomopatogênicos. In: Alves S.B. (Hrsg.). Controle microbiano de insetos: 217-238. FEALQ, Piracicaba.
- Anderson T.E., Hajek A.E., Roberts D.W., Preisler H.K., Robertson J.L. (1989). Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): Effects of combinations of *Beauveria bassiana* with insecticides. *Journal of Economic Entomology* 82(1):83-89.

- Anderson T.E., Roberts D.W. (1983). Compatibility of *Beauveria bassiana* isolates with insecticide formulations used in Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) control. *Journal of Economic Entomology* 76(6):1437-1441.
- Ansari M.A., Shah F.A., Whittaker M., Prasad M., Butt T.M. (2007). Control of western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) pupae with *Metarhizium anisopliae* in peat and peat alternative growing media. *Biological Control* 40:293-297.
- Arakawa T., Carpenter J.F., Kita Y.A., Crowe J.H. (1990). The basis for toxicity of certain cryoprotectants: A hypothesis. *Cryobiology* 27:401-415.
- Arther R.G., Cunningham J., Dorn H., Everett R., Herr L.G., Hopkins T. (1997). Efficacy of imidacloprid for removal and control of fleas (*Ctenocephalides felis*) on dogs. *American Journal of Veterinary Research* 58(8):848-850.
- Arthur D.R. (1962). Ticks and disease. 1. Aufl., Row, Peterson and Company, Evanston.
- Ascher K.R.S. (1993). Nonconventional insecticidal effects of pesticides available from the Neem tree, *Azadirachta indica*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 22:(3-4):433-449.
- Auer D.E., Seawright A.A., Pollitt C.C., Williams G. (1984). Illness in horses following spraying with amitraz. *Australian Veterinary Journal* 61(8):257-259.
- Baffi M.A., Pereira C.D., Lino de Souza G.R., Ceron C.R., Bonetti A.M. (2007). Esterase profile in the postembryonic development of *Rhipicephalus microplus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42(8):1183-1188.
- Bahiense T.C., Fernandes E.K.K., Bittencourt V.R.E.P. (2006). Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. *Veterinary Parasitology* 141(3-4):319-324.
- Baker G.L., Milner R.J., Lutton G.G., Watson D.M. (1994). Preliminary field trial on the control of *Phaulacridium vittatum* (Sjöstedt) (Orthoptera: Acrididae) populations with *Metarhizium flavoviride* Gams and Rozsypal (Deuteromycetina: Hyphomycetes). *Australian Journal of Entomology* 33(2):190-192.
- Barbosa J.V., Daemon E., Bittencourt V.R.E.P., Faccini J.L.H. (1997). Efeitos de dois isolados do fungo *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. sobre a muda larval e a sobre vivência de ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 6(1):53-56.
- Barnes G.L., Boethel D.J., Eikenbary R.D., Criswell J.T., Gentry C.R. (1975). Growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* on media containing various peptone sources. *Journal of Invertebrate Pathology* 25(3):301-305.
- Barré N., Li A.Y., Miller R.J., Gaïa H., Delathière J.-M., Davey R.B., George J.E. (2008). *In vitro* and *in vivo* evaluation of deltamethrin and amitraz mixtures for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in New Caledonia. *Veterinary Parasitology* 155:110-119.

- Batista Filho A., Almeida J.E.M., Lamas C. (2001). Effect of thiamethoxam on entomopathogenic microorganisms. *Neotropical Entomology* 30(3):437-447.
- Bechara G.H., Szabó M.P.J., Ferreira B.R., Garcia M.V. (1995). *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: Feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 4(2):61-66.
- Bernal J.L., del Nozal M.J., Jiménez J.J. (1997). Influence of solvent and storage conditions on the stability of acaricide standard stock solutions. *Journal of Chromatography A* 765(1):109-114.
- Beugnet F., Chardonnet L. (1995). Tick resistance to pyrethroids in New Caledonia. *Veterinary Parasitology* 56(4):325-338.
- Bidochka M.J., Small C.L. (2005). Phylogeography of *Metarhizium*, an insect pathogenic fungi. In: Vega F.E., Blackwell M. (Hrsg.). *Insect-fungal associations: Ecology and evolution*: 28-50. Oxford University, Oxford.
- Bidochka M.J., Khachatourians G.G. (1992). Growth of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on cuticular components from the migratory grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. *Journal of Invertebrate Pathology* 59(2):165-173.
- Bischoff J.F., Rehner S.A., Humber R.A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia* 101(4):512-530.
- Bittencourt V.R.E.P., Massard C.L., Lima A.F. (1994a). Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus*. *Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida* 16(1-2):41-47.
- Bittencourt V.R.E.P., Massard C.L., Lima A.F. (1994b). Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre a fase não parasitária do ciclo biológico de *Boophilus microplus*. *Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida* 16(1-2):49-55.
- Bittencourt V.R.E.P., Massard C.L., Lima A.F. (1992). Uso do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Arquivos de Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro* 15:197-202.
- Blagburn B.L., Lindsay D.S. (2001). Ectoparasiticides. In: Adams H.R. (Hrsg.). *Veterinary pharmacology and therapeutics*: 1017-1039. Iowa State University, Ames.
- Booth T.F. (1989). Wax lipid secretion and ultrastructural development in the egg-waxing (Gené's) organ in ixodid ticks. *Tissue and Cell* 21(1):113-122.
- Boucias D.G., Pendland J.C. (1998). *Principles of insect pathology*. 1. Aufl., Kluwer Academic, Dordrecht.
- Brimecombe R.D., Limson J.L. (2006). Electrochemical investigation of the effect of pH and solvent on amitraz stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(21):8139-8143.

- Bromilow R.H., Evans A.A., Nicholls P.H. (2003). The influence of lipophilicity and formulation on the distribution of pesticides in laboratory-scale sediment/water systems. *Pest Management Science* 59(2):238-244.
- Bryson N.R., Horak I.G., Venter E.H., Yunker C.E. (2000). Collection of free-living nymphs and adults of *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae) with pheromone/carbon dioxide traps at 5 different ecological sites in heartwater endemic regions of South Africa. *Experimental and Applied Acarology* 24(12):971-982.
- Bühl A., Zöfel P. (2000). SPSS Version 10. Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows. 7. Aufl., Addison-Wesley, München.
- Bundesministerium für Gesundheit (2011). Information über Veterinär-Arzneispezialitäten in Österreich, unter "http://www.bmg.gv.at/cms/home/attachments/2/0/4/CH1228/CMS1216820062496/information_aspez.pdf" (zugegriffen am: 13.9.2011).
- Burridge M.J., Simmons L.-A., Allan S.A. (2003). Efficacy of acaricides for control of four tick species of agricultural and public health significance in the United States. *Journal of Agricultural and Urban Entomology* 20(4):207-219.
- Burridge M.J., Peter T.F., Allan S.A., Mahan S.M. (2002). Evaluation of safety and efficacy of acaricides for control of the African tortoise tick (*Amblyomma marmoratum*) on leopard tortoises (*Geochelone pardalis*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 33(1):52-57.
- Campbell R.K., Barnes G.L., Cartwright B.O., Eikenbary R.D. (1983). Growth and sporulation of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* in a basal medium containing various carbohydrate sources. *Journal of Invertebrate Pathology* 41(1):117-121.
- Castro-Janer E., Rifran L., González P., Piaggio J., Gil A., Schumaker T.T.S. (2010). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to fipronil in Uruguay evaluated by *in vitro* bioassays. *Veterinary Parasitology* 169(1-2):172-177.
- Castro-Janer E., Rifran L., Piaggio J., Gil A., Miller R.J., Schumaker T.T.S. (2009). *In vitro* tests to establish LC₅₀ and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. *Veterinary Parasitology* 162(1-2):120-128.
- Cherry L.M. (1969). The production of cuticle wax by engorged females of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini). *Journal of Experimental Biology* 50:705-709.
- Clark R.A., Casagrande R.A., Wallace D.B. (1982). Influence of pesticides on *Beauveria bassiana*, a pathogen of the Colorado potato beetle. *Environmental Entomology* 11(1):67-70.
- Cole L.M., Nicholson R.A., Casida J.E. (1993). Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 46(1):47-54.
- Corta E., Bakkali A., Berrueta L.A., Gallo B., Vicente F. (1999). Kinetics and mechanism of amitraz hydrolysis in aqueous media by HPLC and GC-MS. *Talanta* 48(1):189-199.

- Cossío-Bayúgar R., Miranda-Miranda E., Portilla-Salgado D., Osorio-Miranda J. (2009). Quantitative PCR detection of cholinesterase and carboxylesterase expression levels in acaricide resistant *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Journal of Entomology* 6(2):117-123.
- Cruthers L., Slone R.L., Guerrero J., Robertson-Plouch C. (2001). Evaluation of the speed of kill of fleas and ticks with Frontline[®] Top Spot[®] in dogs. *Veterinary Therapeutics* 2(2):170-174.
- Cruthers L., Guerrero J., Robertson-Plouch C., Corapeake P.L.R.S., Merial N.C., Iselin N.J. (1999). Evaluation of the speed of kill of fleas and ticks with fipronil or Imidacloprid. American Association of Veterinary Parasitologists 44th Annual Meeting, The Intercontinental Hotel, New Orleans, USA.
- da Silva R.Z., Neves P.M.O.J. (2005). Techniques and parameters used in compatibility tests between *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *in vitro* phytosanitary products. *Pest Management Science* 61(7):667-674.
- da Violante G., Zerrouk N., Richard I., Provot G., Chaumeil J.C., Arnaud P. (2002). Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25(12):1600-1603.
- Daly J.C., Fisk J.H., Forrester N.W. (1988). Selective mortality in field trials between strains of *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) resistant and susceptible to pyrethroids: Functional dominance of resistance and age class. *Journal of Medical Entomology* 81(4):1000-1008.
- Dantas-Torres F. (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors* 3(1):26-37.
- Dantas-Torres F. (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Veterinary Parasitology* 152(3-4):173-185.
- Dantas-Torres F., Figueredo L.A. (2006). Canine babesiosis: A Brazilian perspective. *Veterinary Parasitology* 141(3-4):197-203.
- Davey R.B., Miller R.J., George J.E. (2008). Efficacy of amitraz applied as a dip against an amitraz-resistant strain of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) infested on cattle. *Veterinary Parasitology* 152(1-2):127-135.
- Davey R.B., Ahrens E.H., George J.E., Hunter III J.S., Jeannin P. (1998). Therapeutic and persistent efficacy of fipronil against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. *Veterinary Parasitology* 74(2-4):261-276.
- Davey R.B. (1995). Efficacy of topically applied pyrethroids against eggs of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). *Journal of Agricultural Entomology* 12(1):67-73.
- Davey R.B., Cooksey L.M., Despins J.L. (1991). Survival of larvae of *Boophilus annulatus*, *Boophilus microplus*, and *Boophilus* hybrids (Acari: Ixodidae) in different temperature and humidity regimes in the laboratory. *Veterinary Parasitology* 40(3-4):305-313.

- Dayakar S., Kanaujia K.R., Rathore R.R.S. (2001). Compatibility of entomogenous fungi with commonly-used insecticides for the management of *Spodoptera litura* (Fabricius). In: Ignacimuthu S., Sen A. (Hrsg.). Microbials in insect pest management: 47-52. Science, Enfield.
- de la Fuente J., Kocan K.M. (2006). Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunology* 28(7):275-283.
- de Oliveira Monteiro C.M., Daemon E., Aparecido Clemente M., dos Santos Rosa L., Maturano R. (2009). Acaricidal efficacy of thymol on engorged nymphs and females of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1808) (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research* 105(4):1093-1097.
- de Oliveira R.C., Neves P. (2004). Compatibility of *Beauveria bassiana* with acaricides. *Neotropical Entomology* 33(3):353-358.
- Dekeyser M.A. (2005). Acaricide mode of action. *Pest Management Science* 61(2):103-110.
- Delgado F.X., Britton J.H., Onsager J.A., Swearingen W. (1999). Field assessment of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and potential synergism with diflubenzuron for control of Savanna grasshopper complex (Orthoptera) in Mali. *Journal of Invertebrate Pathology* 73(1):34-39.
- Diehl P.A., Aeschlimann A., Obenchain F.D. (1982). Tick reproduction: Oogenesis and oviposition. In: Obenchain F.D., Galun R. (Hrsg.). Physiology of ticks: 277-350 Pergamon, Oxford.
- Dryden M.W., Payne P.A., McBride A., Mailen S., Smith V., Carithers D. (2008). Efficacy of fipronil (9.8% w/w) plus (S)-methoprene (8.8% w/w) and imidacloprid (8.8% w/w) plus permethrin (44% w/w) against *Dermacentor variabilis* (American dog tick) on dogs. *Veterinary Therapeutics* 9(1):15-25.
- Dryden M.W., Payne P.A., Smith V., Hostetler J. (2006a). Evaluation of an imidacloprid (8.8% w/w)-permethrin (44.0% w/w) topical spot-on and a fipronil (9.8% w/w)-(S)-methoprene (8.8% w/w) topical spot-on to repel, prevent attachment, and kill adult *Rhipicephalus sanguineus* and *Dermacentor variabilis* ticks on dogs. *Veterinary Therapeutics* 7(3):189-198.
- Dryden M.W., Payne P.A., Smith V., Hostetler J. (2006b). Evaluation of an imidacloprid (8.8% w/w)-permethrin (44.0% w/w) topical spot-on and a fipronil (9.8% w/w)-(S)-methoprene (8.8% w/w) topical spot-on to repel, prevent attachment, and kill adult *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* ticks on dogs. *Veterinary Therapeutics* 7(3):173-186.
- Duarte A., Menendez J.M., Triguero N. (1992). Estudio preliminar sobre la compatibilidad de *Metarhizium anisopliae* con algunos plaguicidas quimicos. *Revista Forestal Baracoa* 22(2):31-39.
- Ducornez S., Barré N., Miller R.J., de Garine-Wichatitsky M. (2005). Diagnosis of amitraz resistance in *Boophilus microplus* in New Caledonia with the modified Larval Packet Test. *Veterinary Parasitology* 130(3-4):285-292.

- Eckert J., Friedhoff K.T., Zahner H., Deplazes P. (2008). Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. 2. Aufl., Enke, Stuttgart.
- Endris R.G., Matthewson M.D., Cooke D., Amodie D. (2000). Repellency and efficacy of 65% permethrin and 9.7% fipronil against *Ixodes ricinus*. *Veterinary Therapeutics* 1(3):159-168.
- Estrada-Peña A., Rème C. (2005). Efficacy of a collar impregnated with amitraz and pyriproxyfen for prevention of experimental tick infestations by *Rhipicephalus sanguineus*, *Ixodes ricinus*, and *Ixodes scapularis* in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 226(2):221-224.
- Estrada-Peña A., Ascher F. (1999). Comparison of an amitraz-impregnated collar with topical administration of fipronil for prevention of experimental and natural infestations by the brown dog tick (*Rhipicephalus sanguineus*). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 214(12):1799-1803.
- Fernandes E.K.K., da Costa G.L., de Moraes A.M.L., Bittencourt V.R.E.P. (2004). Entomopathogenic potential of *Metarhizium anisopliae* isolated from engorged females and tested in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Basic Microbiology* 44(4):270-274.
- Fernandes F.F. (2001). Toxicological effects and resistance to pyrethroids in *Boophilus microplus* from Goiás, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 53(5):538-543.
- Finney D.J. (1947). Probit Analysis. A statistical treatment of the sigmoid response curve. 1. Aufl., Cambridge University, Cambridge.
- Foil L.D., Coleman P., Eisler M., Fragoso-Sanchez H., Garcia-Vazquez Z., Guerrero F.D., Jonsson N.N., Langstaff I.G., Li A.Y., Machila N., Miller R.J., Morton J., Pruett J.H., Torr S. (2004). Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. *Veterinary Parasitology* 125(1-2):163-181.
- Frazzon A.P.G., da Silva Vaz Jr. I., Masuda A., Schrank A., Vainstein M.H. (2000). *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* 94(1-2):117-125.
- Garcia M.V., Monteiro A.C., Szabó M.P.J., Prette N. (2008). Eventos externos e internos da infecção de larvas e ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* por *Metarhizium anisopliae*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 60(4):855-863.
- Gassner B., Wüthrich A., Lis J., Scholtysik G., Solioz M. (1997). Topical application of synthetic pyrethroids to cattle as a source of persistent environmental contamination. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 32(5):729-739.
- Genthner F.J., Chancy C.A., Couch J.A., Foss S.S., Middaugh D.P., George S.E., Warren M.A., Bantle J.A. (1998). Toxicity and pathogenicity testing of the insect pest control fungus *Metarhizium anisopliae*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35(2):317-324.

- Genthner F.J., Middaugh D.P. (1995). Nontarget testing of an insect control fungus: Effects of *Metarhizium anisopliae* on developing embryos of the inland silverside fish *Menidia beryllina*. *Diseases of aquatic Organisms* 22:163-171.
- George J.E., Pound J.M., Davey R.B. (2004). Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology* 129:S353-S366.
- George J.E., Davey R.B., Ahrens E.H., Pound J.M., Drummond R.O. (1998). Efficacy of amitraz (Taktic® 12.5% EC) as a dip for the control of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) on cattle. *Preventive Veterinary Medicine* 37:55-67.
- Giglioti R., Forim M.R., Oliveira H.N., Chagas A.C.S., Ferrezini J., Brito L.G., Falcoski T.O.R.S., Albuquerque L.G., Oliveira M.C.S. (2011). *In vitro* acaricidal activity of neem (*Azadirachta indica*) seed extracts with known azadirachtin concentrations against *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology* 181(2-4):309-315.
- Gillespie J.P., Kanost M.R. (1997). Biological mediators of insect immunity. *Annual Review of Entomology* 42:611-643.
- Gindin G., Ment D., Rot A., Glazer I., Samish M. (2009). Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae) to tick eggs and the effect of egg cuticular lipids on conidia development. *Journal of Medical Entomology* 46(3):531-538.
- Gindin G., Samish M., Zangi G., Mishoutchenko A., Glazer I. (2002). The susceptibility of different species and stages of ticks to entomopathogenic fungi. *Experimental and Applied Acarology* 28(1-4):283-288.
- Gindin G., Samish M., Alekseev E., Glazer I. (2001). The susceptibility of *Boophilus annulatus* (Ixodidae) ticks to entomopathogenic fungi. *Biocontrol Science and Technology* 11(1):111-118.
- Ginsberg H.S. (1994). Lyme disease and conservation. *Conservation Biology* 8(2):343-353.
- Ginsberg H.S. (1993). Ecology and environmental management of lyme disease. 1. Aufl., Rutgers University New Brunswick.
- Goddard J. (1987). Ticks of medical importance occurring in the western hemisphere, School of Aerospace Medicine, Texas.
- Goettel M.S., Inglis G.D. (1997). Fungi: Hyphomycetes. In: Lacey L.A. (Hrsg.). Manual of techniques in insect pathology: 213-249. Academic, London.
- Guerrero F.D., Pruett J.H., Li A.Y. (2002). Molecular and biochemical diagnosis of esterase-mediated pyrethroid resistance in a Mexican strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology* 28(1-4):257-264.
- Guerrero F.D., Davey R.B., Miller R.J. (2001). Use of an allele-specific polymerase chain reaction assay to genotype pyrethroid resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 38(1):44-50.

- Guglielmone A.A., Robbins R.G., Apanaskevich D.A., Petney T.N., Estrada-Peña A., Horak I.G., Shao R., Barker S.C. (2010). The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: A list of valid species names. *Zootaxa* 2528:1-28.
- Gupta R.C. (2007). *Veterinary toxicology: Basic and clinical principles* 1. Aufl., Elsevier, Amsterdam.
- Habluetzel A., Carnevali F., Lucantoni L., Grana L., Attili A.R., Archilei F., Antonini M., Valbonesi A., Abbadessa V., Esposito F., van der Esch S.A. (2007). Impact of the botanical insecticide NeemAzal® on survival and reproduction of the biting louse *Damalinia limbata* on angora goats. *Veterinary Parasitology* 144(3-4):328-337.
- Hackman R.H., Filshie B.K. (1982). The tick cuticle. In: Obenchain F.D., Galun R. (Hrsg.). *Physiology of ticks: 1-42* Pergamon, Oxford.
- Hagen S. (1997). Akarizidresistenz der veterinärmedizinisch bedeutenden Zeckenspezies *Boophilus microplus* an ausgesuchten Standorten Zentralamerikas. Diss., Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Hainzl D., Cole L.M., Casida J.E. (1998). Mechanisms for selective toxicity of fipronil insecticide and its sulfone metabolite and desulfinyl photoproduct. *Chemical Research in Toxicology* 11(12):1529-1535.
- Hainzl D., Casida J.E. (1996). Fipronil insecticide: Novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(23):12764-12767.
- Hajek A.E., St. Leger R.J. (1994). Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology* 39:239-322.
- Hanslick J.L., Lau K., Noguchi K.K., Olney J.W., Zorumski C.F., Mennerick S., Farber N.B. (2009). Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiology of Disease* 34(1):1-10.
- Hartelt K., Wurst E., Collatz J., Zimmermann G., Kleespies R.G., Oehme R.M., Kimmig P., Steidle J.L.M., Mackenstedt U. (2008). Biological control of the tick *Ixodes ricinus* with entomopathogenic fungi and nematodes: Preliminary results from laboratory experiments. *International Journal of Medical Microbiology* 298:314-320.
- Hassan A.E.M., Charnley A.K. (1989). Ultrastructural study of the penetration by *Metarhizium anisopliae* through dimilin-affected cuticle of *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology* 54(1):117-124.
- Hatzinger R., Nagel H. (2009). *PASW Statistics - Statistische Methoden und Fallbeispiele*. 1. Aufl., Pearson, München.
- He H., Chen A.C., Davey R.B., Ivie G.W., George J.E. (1999). Identification of a point mutation in the *para*-type sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 261(3):558-561.
- Heath A.C.G. (1979). The temperature and humidity preferences of *Haemaphysalis longicornis*, *Ixodes holocyclus* and *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodidae): Studies on eggs. *International Journal for Parasitology* 9(1):33-39.

- Hiromori H., Nishigaki J. (2001). Factor analysis of synergistic effect between the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and synthetic insecticides. *Applied Entomology and Zoology* 36(2):231-236.
- Hiromori H., Nishigaki J. (1998). Joint action of an entomopathogenic fungus (*Metarhizium anisopliae*) with synthetic insecticides against the scarab beetle, *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae) larvae. *Applied Entomology and Zoology* 33(1):77-84.
- Hirose E., Neves P.M.O.J., Zequi J.A.C., Martins L.H., Peralta C.H., Moino Jr. A. (2001). Effect of biofertilizers and neem oil on the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 44(4):419-423.
- Hoffmann G. (1992). Schadwirkungen durch tierische Gesundheitsschädlinge, Insektizide und Akarizide. *Bundesgesundheitsblatt* 12:603-612.
- Hoffmann G. (1980). Bekämpfung der braunen Hundezecke (*Rhipicephalus sanguineus* L.) in Wohnungen und Ställen. *Bundesgesundheitsblatt* 23(5/6):64-74.
- Holdsworth P.A., Kemp D., Green P., Peter R.J., de Bruin C., Jonsson N.N., Letonja T., Rehbein S., Vercruyse J. (2006). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of acaricides against ticks (Ixodidae) on ruminants. *Veterinary Parasitology* 136(1):29-43.
- Hornbostel V.L., Zhioua E., Benjamin M.A., Ginsberg H.S., Ostfeld R.S. (2005). Pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes) and permethrin to *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) nymphs. *Experimental and Applied Acarology* 35(4):301-316.
- Horowitz A.R., Ishaaya I. (2004). Insect pest management: Field and protected crops. 1. Aufl., Springer, Berlin.
- Insecticide Resistance Action Committee (2005). eClassification, unter "<http://www.iraconline.org/eClassification/>" (zugegriffen am: 31.08.2012).
- Jamroz R.C., Guerrero F.D., Pruett J.H., Oehler D.D., Miller R.J. (2000). Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *Journal of Insect Physiology* 46(5):685-695.
- Jaramillo J., Borgemeister C., Ebssa L., Gaigl A., Tobón R., Zimmermann G. (2005). Effect of combined applications of *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain CIAT 224 and different dosages of imidacloprid on the subterranean burrower bug *Cyrtomenus bergi* Froeschner (Hemiptera: Cydnidae). *Biological Control* 34(1):12-20.
- Jittapalapong S., Stich R.W., Gordon J.C., Wittum T.E., Barriga O.O. (2000). Performance of female *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) fed on dogs exposed to multiple infestations or immunization with tick salivary gland or midgut tissues. *Journal of Medical Entomology* 37(4):601-611.

- Johns R., Ohnishi J., Broadwater A., Sonenshine D.E., de Silva A.M., Hynes W.L. (2001). Contrasts in tick innate immune responses to *Borrelia burgdorferi* challenge: Immunotolerance in *Ixodes scapularis* versus immunocompetence in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 38(1):99-107.
- Jongejan F., Uilenberg G. (2004). The global importance of ticks. *Parasitology* 129:S3-S14.
- Jonsson N.N., Hope M. (2007). Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* 146(3-4):193-198.
- Jonsson N.N., Miller R.J., Robertson J.L. (2007). Critical evaluation of the modified-adult immersion test with discriminating dose bioassay for *Boophilus microplus* using American and Australian isolates. *Veterinary Parasitology* 146(3-4):307-315.
- Kaaya G.P., Hassan S. (2000). Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Experimental and Applied Acarology* 24(12):913-926.
- Kaaya G.P., Mwangi E.N., Ouna E.A. (1996). Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 67(1):15-20.
- Kaaya G.P., Okech M.A. (1990). Horizontal transmission of mycotic infection in adult tsetse, *Glossina morsitans morsitans*. *Entomophaga* 35(4):589-600.
- Karatolos N., Denholm I., Williamson M., Nauen R., Gorman K. (2010). Incidence and characterisation of resistance to neonicotinoid insecticides and pymetrozine in the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pesticide Management Science* 66:1304-1307.
- Khan C.M. (2010). The Merck veterinary manual. 10. Aufl., Merck, Whitehouse Station.
- Kirkland B.H., Cho E.-M., Keyhani N.O. (2004a). Differential susceptibility of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control* 31(3):414-421.
- Kirkland B.H., Westwood G.S., Keyhani N.O. (2004b). Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. *Journal of Medical Entomology* 41(4):705-711.
- Kocan K.M., de la Fuente J., Manzano-Roman R., Naranjo V., Hynes W.L., Sonenshine D.E. (2008). Silencing expression of the defensin, varisin, in male *Dermacentor variabilis* by RNA interference results in reduced *Anaplasma marginale* infections. *Experimental Applied Acarology* 46(1-4):17-28.
- Kocan K.M., Yoshioka J., Sonenshine D.E., de la Fuente J., Ceraul S.M., Blouin E.F., Almazán C. (2005). Capillary tube feeding system for studying tick-pathogen interactions of *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) *Journal of Medical Entomology* 42(5):864-874.

- Koch H.G., Burkwhat H.E. (1984). Susceptibility of the brown dog tick (Acari: Ixodidae) to fresh residues of acaricides: Laboratory assays and comparison of susceptibility of different life stages of the lone star and American dog tick. *Journal of Economic Entomology* 77(3):670-674.
- Koch H.G. (1983). Lone star ticks: Oviposition, egg hatch, and molting under naturally fluctuating ambient temperatures and humidities in the field. *The Southwestern Entomologist* 8(1):1-5.
- Koch H.G. (1982). Seasonal incidence and attachment sites of ticks (Acari: Ixodidae) in domestic dogs in Southeastern Oklahoma and northwestern Arkansas, USA. *Journal of Medical Entomology* 19(3):293-298.
- Kočišová A., Para L. (1999). Possibilities of long-term protection against blood-sucking insects and ticks. *Central European Journal of Public Health* 7(1):27-30.
- Köhler W., Schachtel G., Voleske P. (2002). Biostatistik. 3. Aufl., Springer, Berlin.
- Kramer T., Nauen R. (2011). Monitoring of spirodiclofen susceptibility in field populations of European red mites, *Panonychus ulmi* (Koch) (Acari: Tetranychidae), and the cross-resistance pattern of a laboratory-selected strain. *Pest Management Science* 67(10):1285-1293.
- Kunkle G. (1997). An updated review of ectoparasiticide treatments in dogs and cats. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 20:S110-S120.
- Kurup S.P., Azhahianambi P., Ghosh S. (2008). Effect of surface area to weight ratio of egg masses on the hatchability of *Boophilus microplus* eggs. *Journal of Vector Borne Diseases* 45:164-169.
- Lane R.S., Anderson J.R. (1984). Efficacy of permethrin as a repellent and toxicant for personal protection against the Pacific coast tick and the pajaroello tick (Acari: Ixodidae and Argasidae). *Journal of Medical Entomology* 21(6):692-702.
- Langewald J., Ouambama Z., Mamadou A., Peveling R., Stol I., Bateman R., Attignon S., Blanford S., Arthurs S., Lomer C. (1999). Comparison of an organophosphate insecticide with a mycoinsecticide for the control of *Oedaleus senegalensis* (Orthoptera: Acrididae) and other Sahelian grasshoppers at an operational scale. *Biocontrol Science and Technology* 9(2):199-214.
- Latif A.A. (1984). Resistance to natural tick infestations in different breeds of cattle in the Sudan. *Insect Science and its Application* 5(2):95-97.
- Lecuona R.E., Edelstein J.D., Berretta M.F., La Rossa F.R., Arcas J.A. (2001). Evaluation of *Beauveria bassiana* (Hyphomycetes) strains as potential agents for control of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *Journal of Medical Entomology* 38(2):172-179.
- Leemon D.M., Jonsson N.N. (2008). Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. *Journal of Invertebrate Pathology* 97(1):40-49.

- Leemon D.M., Turner L.B., Jonsson N.N. (2008). Pen studies on the control of cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). *Veterinary Parasitology* 156(3-4):248-260.
- Lees A.D., Beament J.W.L. (1948). An egg-waxing organ in ticks. *Quarterly Journal of Microscopical Science* 89:291-332.
- Li A.Y., Davey R.B., Miller R.J., Guerrero F.D., George J.E. (2008). Genetics and mechanisms of permethrin resistance in the Santa Luiza strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 45(3):427-438.
- Li A.Y., Chen A.C., Miller R.J., Davey R.B., George J.E. (2007). Acaricide resistance and synergism between permethrin and amitraz against susceptible and resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Pest Management Science* 63(9):882-889.
- Li A.Y., Davey R.B., Miller R.J., George J.E. (2004). Detection and characterization of amitraz resistance in the southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 41(2):193-200.
- Lighton J.R.B., Fielden L.J., Rechav Y. (1993). Discontinuous ventilation in a non-insect, the tick *Amblyomma marmoreum* (Acari: Ixodidae): Characterization and metabolic modulation. *Journal of Experimental Biology* 180:229-245.
- Little S.E., Hostetler J., Kocan K.M. (2007). Movement of *Rhipicephalus sanguineus* adults between co-housed dogs during active feeding. *Veterinary Parasitology* 150(1-2):139-145.
- Locke J.C. (2002). Fungi. In: Schmutterer H. (Hrsg.). The neem tree *Azadirachta indica* A. Juss. and other meliaceous plants. Sources of unique natural products for integrated pest management, medicine, industry and other purposes: 156-165. Neem Foundation, Mumbai.
- Louly C.C.B., Fonseca I.N., Oliveira V.F., Linhares G.F.C., Menezes L.B., Borges L.M.F. (2007). Seasonal dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in dogs from a police unit in Goiânia, Goiás, Brazil. *Ciência Rural* 37(2):464-469.
- Lounsbury C.P. (1899). The bont tick. *Amblyomma hebraeum* Koch. Its life history and habits. *Agricultural Journal of the Cape of Good Hope* 15:728-743.
- Loureiro E.d.S., Moino Jr. A., Arnosti A., de Souza G.C. (2002). Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. *Neotropical Entomology* 31(2):263-269.
- Luz C., Tigano M.S., Silva I.G., Cordeiro C.M.T., Aljanabi S.M. (1998). Selection of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to control *Triatoma infestans*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93(6):839-846.
- McVay J.R., Gudauskas R.T., Harper J.D. (1977). Effects of *Bacillus thuringiensis* nuclear-polyhedrosis virus mixtures on *Trichoplusia ni* larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 29(3):367-372.
- Mehlhorn B., Mehlhorn H. (1996). Zecken, Milben, Fliegen, Schaben: Schach dem Ungeziefer. 3. Aufl., Springer, Berlin.

- Mehlhorn H., Piekarski G. (2002). Grundriß der Parasitenkunde: Parasiten des Menschen und der Nutztiere. 6. Aufl., Spektrum, Heidelberg.
- Melo D.R., Reis R.C.S., Bittencourt V.R.E.P. (2006). Patogenicidade *in vitro* do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 15(4):157-162.
- Ment D., Gindin G., Soroker V., Glazer I., Rot A., Samish M. (2010). *Metarhizium anisopliae* conidial responses to lipids from tick cuticle and tick mammalian host surface. *Journal of Invertebrate Pathology* 103(2):132-139.
- Mietkiewski R.T., Pell J.K., Clark S.J. (1997). Influence of pesticide use on the natural occurrence of entomopathogenic fungi in arable soils in the UK: Field and laboratory comparisons. *Biocontrol Science and Technology* 7(4):565-576.
- Miller J.A., Davey R.B., George J.E. (1999). Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 36(5):533-538.
- Miller R.J., Rentaria J.A.E., Quiroz Martinez H., George J.E. (2007). Characterization of permethrin-resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected from the state of Coahuila, Mexico. *Journal of Medical Entomology* 44(5):895-897.
- Miller R.J., George J.E., Guerrero F., Carpenter L., Welch J.B. (2001). Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) collected from the Corozal Army Veterinary Quarantine Center, Panama. *Journal of Medical Entomology* 38(2):298-302.
- Miranda-Miranda E., Cossío-Bayúgar R., Quezada-Delgado M.D.R., Olvera-Valencia F., Neri-Orantes S. (2009). Age-induced carboxylesterase expression in acaricide-resistant *Rhipicephalus microplus*. *Research Journal of Parasitology* 4(3):70-78.
- Mochi D.A., Monteiro A.C., Barbosa J.C. (2005). Action of pesticides to *Metarhizium anisopliae* in soil. *Neotropical Entomology* 34(6):961-971.
- Moffat A.S. (1993). New chemicals seek to outwit insect pests. *Science* 261(5121):550-551.
- Mohamed A.K.A., Pratt J.P., Nelson F.R.S. (1987). Compatability of *Metarhizium anisopliae* var. *anisopliae* with chemical pesticides. *Mycopathologia* 99(2):99-105.
- Moino Jr. A., Alves S.B. (1998). Efeito de imidacloprid e fipronil sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. e *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. e no comportamento de limpeza de *Heterotermes tenuis* (Hagen). *Anais da Sociedade Entomológica do Brasil* 27(4):611-619.
- Morales-Rodriguez A., Peck D.C. (2009). Synergies between biological and neonicotinoid insecticides for the curative control of the white grubs *Amphimallon majale* and *Popillia japonica*. *Biological Control* 51(1):169-180.
- Mount G.A. (1984). Aerial application of diazinon granules for area control of the lone star tick (Acari: Ixodidae). *Journal of Economic Entomology* 77(5):1211-1213.

- Moyo B., Masika P.J. (2009). Tick control methods used by resource-limited farmers and the effect of ticks on cattle in rural areas of the Eastern Cape Province, South Africa. *Tropical Animal Health and Production* 41(4):517-523.
- Mtshali M.S., de Waal D.T., Mbatia P.A. (2004). A sero-epidemiological survey of blood parasites in cattle in the north-eastern Free State, South Africa. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 71(1):67-75.
- Mumcuoglu K.Y., Frish K., Sarov B., Manors E., Gross E., Gat Z., Galun R. (1993). Ecological studies on the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in southern Israel and its relationship to spotted fever group Rickettsiae. *Journal of Medical Entomology* 30(1):114-121.
- Munthali D.C. (1984). Biological efficiency of small dicofol droplets against *Tetranychus urticae* (Koch) eggs, larvae and protonymphs. *Crop Protection* 3(3):327-334.
- Nakasone K.K., Peterson S.W., Jong S.-C. (2004). Preservation and distribution of fungal cultures. In: Mueller G.M., Bills G.F., Foster M.S. (Hrsg.). Biodiversity of fungi: Inventory and monitoring methods 37-48. Elsevier, Amsterdam.
- Natala A.J., Agyei A.D., Awumbila B. (2005). Susceptibility of *Amblyomma variegatum* ticks to acaricides in Ghana. *Experimental and Applied Acarology* 35(3):259-268.
- Nauen R., Bielza P., Denholm I., Gorman K. (2008). Age-specific expression of resistance to a neonicotinoid insecticide in the whitefly *Bemisia tabaci*. *Pest Management Science* 64(11):1106-1110.
- Nauen R., Smagghe G. (2006). Mode of action of etoxazole. *Pesticide Management Science* 62(5):379-382.
- Needham G.R., Teel P.D. (1991). Off-host physiological ecology of ixodid ticks. *Annual Review of Entomology* 36:659-681.
- Neves P.M.O.J., Hirose E., Tchujo P.T., Moino Jr. A. (2001). Compatibility of entomopathogenic fungi with neonicotinoid insecticides. *Neotropical Entomology* 30(2):263-268.
- Nicholson W.L., Sonenshine D.E., Lane R.S., Uilenberg G. (2009). Ticks (Ixodida). In: Mullen G.R. (Hrsg.). Medical and veterinary entomology: 493-542. Elsevier, Amsterdam.
- Nolan J. (1990). Acaricide resistance in single and multi-host ticks and strategies for control. *Parassitologia* 32(1):145-153.
- Nolan J. (1981). Current developments in resistance to amidine and pyrethroid tickicides in Australia. Tick biology and control: Proceedings of an international conference, Grahamstown, South Africa.
- Nolan J., Roulston W.J., Schnitzerling H.J. (1979). The potential of some synthetic pyrethroids for control of the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Australian Veterinary Journal* 55(10):463-466.

- Norval R.A.I., Sonenshine D.E., Allan S.A., Burridge M.J. (1996a). Efficacy of pheromone acaricide-impregnated tail-tag decoys for controlling the bont tick, *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae), on cattle in Zimbabwe. *Experimental and Applied Acarology* 20(1):31-46.
- Norval R.A.I., Sutherst R.W., Kerr J.D. (1996b). Infestations of the bont tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae) on different breeds of cattle in Zimbabwe. *Experimental and Applied Acarology* 20(10):599-605.
- Norval R.A.I., Perry B.D., Meltzer M.I., Kruska R.L., Booth T.H. (1994). Factors affecting the distributions of the ticks *Amblyomma hebraeum* and *A. variegatum* in Zimbabwe: Implications of reduced acaricide usage. *Experimental and Applied Acarology* 18(7):383-407.
- Norval R.A.I., Peter T., Meltzer M.I. (1992). A comparison of the attraction of nymphs and adults of the ticks *Amblyomma hebraeum* and *A. variegatum* to carbon dioxide and the male-produced aggregation-attachment pheromone. *Experimental and Applied Acarology* 13(3):179-186.
- Norval R.A.I., Butler J.F., Yunker C.E. (1989). Use of carbon dioxide and natural or synthetic aggregation-attachment pheromone of the bont tick, *Amblyomma hebraeum*. *Experimental and Applied Acarology* 7(3):171-180.
- Norval R.A.I. (1977a). Ecology of the tick *Amblyomma hebraeum* Koch in the Eastern Cape province of South Africa. I. Distribution and seasonal activity. *The Journal of Parasitology* 63(4):734-739.
- Norval R.A.I. (1977b). Studies on the ecology of the tick *Amblyomma hebraeum* Koch in the Eastern Cape province of South Africa. II. Survival and development. *The Journal of Parasitology* 63(4):740-747.
- Núñez J.L., Muñoz-Cobeñas M.E., Moltedo H.L. (1985). *Boophilus microplus*: The common cattle tick. 1. Aufl., Springer, Berlin.
- Núñez J.L., Pugliese M.E., Hayes R.P. (1972). *Boophilus microplus* Can. Estudio sobre los estadios parasitarios del ciclo biológico. *Revista de Medicina Veterinaria* 53(1):19-35.
- Nuttall G.H.F. (1915). Observations on the biology of Ixodidae. *Parasitology* 7(4):408-456
- Ocaido M., Muwazi R.T., Asibo Opuda J. (2009). Economic impact of ticks and tick-borne diseases on cattle production systems around Lake Mburo National Park in south western Uganda. *Tropical Animal Health and Production* 41(5):731-739.
- Oliveira P.R., Bechara G.H., Denardi S.E., Aparecido Pizano M., Camargo Mathias M.I. (2011). Toxicity effect of the acaricide fipronil in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): Preliminary determination of the minimum lethal concentration and LC₅₀. *Experimental Parasitology* 127(2):418-422.
- Oliveira R.O., Mendes M.C., Jensen J.R., Vieira-Bressan M.C.R. (2000). Determination of the minimum immersion time of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) engorged females for *in vitro* resistance tests with amitraz at 50% effective concentration (EC₅₀). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 9(1):41-43.

- Olmert I., Kenneth R.G. (1974). Sensitivity of entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, *Verticillium lecanii*, and *Verticillium sp.* to fungicides and insecticides. *Environmental Entomology* 3(1):33-38.
- Onofre S.B., Miniuk C.M., de Barros N.M., Azevedo J.L. (2001). Pathogenicity of four strains of entomopathogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. *American Journal of Veterinary Research* 62(9):1478-1480.
- Osano O., Admiraal W., Klamer H.J.C., Pastor D., Bleeker E.A.J. (2002). Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*. *Environmental Pollution* 119(2):195-202.
- Pachamuthu P., Kamble S.T. (2000). *In vivo* study on combined toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain ESC-1 with sublethal doses of chlorpyrifos, propetamphos, and cyfluthrin against German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Journal of Economic Entomology* 93(1):60-70.
- Patrick C.D., Hair J.A. (1979). Oviposition behavior and larval longevity of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acarina: Ixodidae), in different habitats. *Annals of the Entomological Society of America* 72(2):308-312.
- Pegram R.G., James A.D., Osterwijk G.P.M., Killorn K.J., Lemche J., Ghirotti M., Tekle Z., Chizyuka H.G.B., Mwase E.T., Chizhuka F. (1991). Studies on the economics of ticks in Zambia. *Experimental and Applied Acarology* 12(1-2):9-26.
- Pegram R.G., Keirans J.E., Clifford C.M., Walker J.B. (1987). Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari: Ixodoidea, Ixodidae). II. *R. sanguineus* (Latreille, 1806) and related species. *Systematic Parasitology* 10(1):27-44.
- Peter R.J., van den Bossche P., Penzhorn B.L., Sharp B. (2005). Tick, fly, and mosquito control - Lessons from the past, solutions for the future. *Veterinary Parasitology* 132(3-4):205-215.
- Peveling R., Demba S.A. (2003). Toxicity and pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) and fipronil to the fringe-toed lizard *Acanthodactylus dumerili* (Squamata: Lacertidae). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(7):1437-1447.
- Pierpoint A.C., Hapeman C.J., Torrents A. (1997). Kinetics and mechanism of amitraz hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(5):1937-1939.
- Polar P., Kairo M.T.K., Peterkin D., Moore D., Pegram R., John S.-A. (2005). Assessment of fungal isolates for development of a myco-acaricide for cattle tick control. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 5(3):276-284.
- Polasek W. (2008). Schließende Statistik: Einführung in die Schätz- und Testtheorie für Wirtschaftswissenschaftler. 1. Aufl., Springer, Berlin.
- Postal J.-M.R., Jeannin P.C., Consalvi P.-J. (1995). Field efficacy of a mechanical pump spray formulation containing 0.25% fipronil in the treatment and control of flea infestation and associated dermatological signs in dogs and cats. *Veterinary Dermatology* 6(3):153-158.

- Pound J.M., Miller J.A., George J.E., Fish D., Carroll J.F., Schulze T.L., Daniels T.J., Falco R.C., Stafford III K.C., Mather T.N. (2009). The United States Department of Agriculture's northeast area-wide tick control project: Summary and conclusions. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 9(4):439-448.
- Prabhaker N., Toscano N.C., Coudriet D.L. (1989). Susceptibility of the immature and adult stages of the sweetpotato whitefly (Homoptera: Aleyrodidae) to selected insecticides. *Journal of Economic Entomology* 82(4):983-988.
- Prette N., Monteiro A.C., Garcia M.V., Soares V.E. (2005). Patogenicidade de isolados de *Beauveria bassiana* para ovos, larvas e ninfas ingurgitadas de *Rhipicephalus sanguineus*. *Ciência Rural* 35(4):855-861.
- Pruett J.H., Guerrero F.D., Hernandez R. (2002). Isolation and identification of an esterase from a Mexican strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Economic Entomology* 95(5):1001-1007.
- Prullage J.B., Cawthorne W.G., Le Hir de Fallois L.P., Timmons P.R. (2011). Synergy between fipronil and amitraz in a *Rhipicephalus sanguineus* tick residual contact test. *Experimental and Applied Acarology* 54(2):173-176.
- Purwar J.P., Sachan G.C. (2006). Synergistic effect of entomogenous fungi on some insecticides against Bihar hairy caterpillar *Spilarctia obliqua* (Lepidoptera: Arctiidae). *Microbiological Research* 161(1):38-42.
- Quintela E.D., McCoy C.W. (1998a). Conidial attachment of *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* to the larval cuticle of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) treated with imidacloprid. *Journal of Invertebrate Pathology* 72(3):220-230.
- Quintela E.D., McCoy C.W. (1998b). Synergistic effect of imidacloprid and two entomopathogenic fungi on the behavior and survival of larvae of *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae) in soil. *Journal of Economic Entomology* 91(1):110-122.
- Randolph S.E. (1979). Population regulation in ticks: The role of acquired resistance in natural and unnatural hosts. *Parasitology* 79(1):141-156.
- Rechav Y., Kostrzewski M.W., Els D.A. (1991). Resistance of indigenous African cattle to the tick *Amblyomma hebraeum*. *Experimental and Applied Acarology* 12(3-4):229-241.
- Rechav Y., Whitehead G.B.N. (1978). Field trials with pheromone-acaricide mixtures for control of *Amblyomma hebraeum* (Acarina: Ixodidae). *Journal of Economic Entomology* 71(1):149-151.
- Reis R.C.S., Fernandes E.K.K., Bittencourt V.R.E.P. (2008). Fungal formulations to control *Rhipicephalus sanguineus* engorged females. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1149(1):239-241.

- Reis R.C.S., Melo D.R., Souza E.J., Bittencourt V.R.E.P. (2001). Ação *in vitro* dos fungos *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill e *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok sobre ninfas e adultos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 53(5):544-547.
- Ribeiro V.L.S., Campiol dos Santos J., Bordignon S.A.L., Apel M.A., Henriques A.T., von Poser G.L. (2010). Acaricidal properties of the essential oil from *Hesperozygis ringens* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Bioresource Technology* 101(7):2506-2509.
- Richter A., Steuber S. (2010). Antiparasitica. In: Frey H.-H., Löscher W. (Hrsg.). Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie: 469-526. Enke, Stuttgart.
- Roberts D.W., St. Leger R.J. (2004). *Metarhizium spp.*, cosmopolitan insect-pathogenic fungi: Mycological aspects. *Advances in Applied Microbiology* 54:1-70.
- Roditakis E., Couzin I.D., Balrow K., Franks N.R., Charnley A.K. (2000). Improving secondary pick up of insect fungal pathogen conidia by manipulating host behaviour. *Annals of Applied Biology* 137(3):329-335.
- Roma G.C., Oliveira P.R., Aparecido Pizano M., Camargo Mathias M.I. (2009). Determination of LC₅₀ of permethrin acaricide in semi-engorged females of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology* 123(3):269-272.
- Sáenz-de-Cabezón Irigaray F.J., Marco-Mancebón V., Pérez-Moreno I. (2003). The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* and its compatibility with triflumuron: Effects on the twospotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Biological Control* 26(2):168-173.
- Samish M., Gindin G., Alekseev E., Glazer I. (2001). Pathogenicity of entomopathogenic fungi to different developmental stages of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Parasitology* 87(6):1355-1359.
- Samish M. (2000). Biocontrol of ticks. *Annals of the New York Academy of Sciences* 916:172-178.
- Samish M., Rehacek J. (1999). Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annual Review of Entomology* 44:159-182.
- Samson R.A., Evans H.C., Latgé J.-P. (1988). Atlas of entomopathogenic fungi. 1. Aufl., Springer, Berlin.
- Santos N.C., Figueria-Coelho J., Martins-Silva J., Saldanha C. (2003). Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: Pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology* 65(7):1035-1041.
- Schaerfenberg B. (1968). Untersuchungen über die Wirkung der insektentötenden Pilze *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. und *Metharizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. auf Warmblütler. *Entomophaga* 13(2):175-182.
- Schmidt-Nielsen K. (1984). Scaling: Why is animal size so important? 1. Aufl., Cambridge University, Cambridge.

- Schmutterer H. (1990). Properties and potential of natural pesticides from the neem tree, *Azadirachta indica*. *Annual Review of Entomology* 35:271-297.
- Schulze T.L., Jordan R.A., Krivenko A.J. (2005). Effects of barrier application of granular deltamethrin on subadult *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) and nontarget forest floor arthropods. *Journal of Economic Entomology* 98(3):976-981.
- Schulze T.L., Jordan R.A., Hung R.W., Krivenko A.J., Schulze J.J., Jordan T.M. (2001). Effects of an application of granular carbaryl on nontarget forest floor arthropods. *Journal of Economic Entomology* 94(1):123-128.
- Schumacher V., Poehling H.-M. (2012). *In vitro* effect of pesticides on the germination, vegetative growth and conidial production of two strains of *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Biology* 116(1):121-132.
- Shah F.A., Ansari M.A., Prasad M., Butt T.M. (2007). Evaluation of black vine weevil (*Otiiorhynchus sulcatus*) control strategies using *Metarhizium anisopliae* with sublethal doses of insecticides in disparate horticultural growing media. *Biological Control* 40(2):246-252.
- Shah P.A., Pell J.K. (2003). Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61(5-6):413-423.
- Sheets J.J. (2007). Chitin synthesis and inhibitors. In: Krämer W., Schirmer U. (Hrsg.). *Modern crop protection compounds, Volume 3: Insecticides: 813-824*. Wiley-VCH, Weinheim.
- Smith E.H., Salkeld E.H. (1966). The use and action of ovicides. *Annual Review of Entomology* 11:331-368.
- Smith R.J., Gula E.A. (1982). Toxic components on the larval surface of the corn earworm (*Heliothis zea*) and their effects on germination and growth of *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology* 39(1):15-22.
- Soberanes N.C., Vargas S.M., Fragosos H.S., Garcia, Z.V. (2002). First case reported of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus* in Mexico. *Tecnica pecuaria en Mexico* 40(1):81-92.
- Sonenshine D.E. (1991). *Biology of ticks - Volume 1*. 1. Aufl., Oxford University, Oxford.
- Sonenshine D.E. (1993). *Biology of ticks - Volume 2*. 1. Aufl., Oxford University, Oxford.
- Souza E.J., Reis R.C.S., Bittencourt V.R.E.P. (1999). Evaluation of *in vitro* effect of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on eggs and larvae of *Amblyomma cajennense*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 8(2):127-131.
- Srivastava R., Ghosh S., Mandal D.B., Azhahianambi P., Singhal P.S., Pandey N.N., Swarup D. (2008). Efficacy of *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus*. *Parasitology Research* 104(1):149-153.
- St. Leger R.J., Cooper R.M., Charnley A.K. (1988). The effect of melanization of *Manduca sexta* cuticle on growth and infection by *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 52(3):459-470.

- St. Leger R.J., Cooper R.M., Charnley A.K. (1986). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Cuticle degradation *in vitro* by enzymes from entomopathogens. *Journal of Invertebrate Pathology* 47(2):167-177.
- Sun M., Ren Q., Liu Z., Guan G., Gou H., Ma M., Li Y., Liu A., Yang J., Yin H., Luo J. (2011). *Beauveria bassiana*: Synergistic effect with acaricides against the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology* 128(3):192-195.
- Suzuki J., Ishida T., Shibuya I., Toda K. (2001). Development of a new acaricide, etoxazole. *Journal of Pesticide Science* 26(2):215-223.
- Szabó M.P.J., Bechara G.H. (1999). Sequential histopathology at the *Rhipicephalus sanguineus* tick feeding site on dogs and guinea pigs. *Experimental and Applied Acarology* 23(11):915-928.
- Szafranek B., Maliński E., Nawrot J., Sosnowska D., Ruszkowska M., Pihlaja K., Trumpakaj Z., Szafranek J. (2001). *In vitro* effects of cuticular lipids of the aphids *Sitobion avenae*, *Hyalopterus pruni* and *Brevicoryne brassicae* on growth and sporulation of the *Paecilomyces fumosoroseus* and *Beauveria bassiana*. *Archive for Organic Chemistry* 2(3):81-94.
- Tamai M.A., Alves S.B., Lopes R.B., Faion M., Padulla L.F.L. (2002). Toxicidade de produtos fitossanitários para *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. *Arquivos do Instituto Biológico* 69(3):89-96.
- Tamura Y., Tsubaki Y., Terada Y., Kohmoto M., Kamio T. (2004). The efficacy of etoxazole against *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae), as a tick control agent. *Medical Entomology and Zoology* 55(4):303-311.
- Theis J.H., Budwiser P.D. (1974). *Rhipicephalus sanguineus*: Sequential histopathology at the host-arthropod interface. *Experimental Parasitology* 36(1):77-82.
- Thomas M.B., Wood S.N., Langewald J., Lomer C.J. (1997). Persistence of *Metarhizium flavoviride* and consequences for biological control of grasshoppers and locusts. *Pesticide Science* 49(1):47-55.
- Thomas M.B., Wood S.N., Lomer C.J. (1995). Biological control of locusts and grasshoppers using a fungal pathogen: The importance of secondary cycling. *Proceedings: Biological Sciences* 259(1356):265-270.
- Ungemach F.R. (2010). Antiparasitika. In: Löscher W., Ungemach F.R., Kroker R. (Hrsg.). *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*: 298-353. Enke, Stuttgart.

- United States Environmental Protection Agency (1996). New Pesticide fact sheet EPA 737-F-96-005., unter "<http://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/P1001KCY.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=1995+Thru+1999&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A\zyfiles\Index%20Data\95thru99\Txt\00000021\P1001KCY.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h|-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=p|f&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL>" (zugegriffen am: 31.08.2012).
- Valentine W.M. (1990). Pyrethrin and pyrethroid insecticides. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 20(2):375-382.
- Vilcinskas A., Götz P. (1999). Parasitic fungi and their interactions with the insect immune system. In: Baker J.R., Muller R., Rollinson D. (Hrsg.). *Advances in parasitology: Volume 43: 267-313*. Academic, London.
- Vilcinskas A., Mařha V. (1997). Effect of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* on the humoral immune response of *Galleria mellonella* larvae (Lepidoptera: Pyralidae). *European Journal of Entomology* 94:461-472.
- Walker J.B., Keirans J.E., Horak I.G. (2000). The Genus *Rhipicephalus* (Acari: Ixodidae) - A guide to the brown ticks of the world. 1. Aufl., Cambridge University, Cambridge.
- Wall R., Strong L. (1987). Environmental consequences of treating cattle with the antiparasitic drug ivermectin. *Nature* 327:418-421.
- Wallade S.M., Rice M.J. (1982). The sensory basis of tick feeding behaviour. In: Obenchain F.D., Galun R. (Hrsg.). *Physiology of ticks: 71-118*. Pergamon, Oxford.
- Walstad J.D., Anderson R.F., Stambaugh W.J. (1970). Effects of environmental conditions on two species of muscardine fungi (*Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*). *Journal of Invertebrate Pathology* 16(2):221-226.
- Ware G.W., Whitacre D.M. (2004). *The Pesticide Book*. 6. Aufl., MeisterPro Information Resources, Willoughby.
- Wharton R.H., Roulston W.J. (1970). Resistance of ticks to chemicals. *Annual Review of Entomology* 15:381-404.
- Wiedemann C. (2000). Zur Wirksamkeit von Fipronil (Frontline®) gegen Ektoparasiten: Teil II - Zeckenbefall. *Tierärztliche Umschau* 55(4):211-216.
- Wilkinson P.R. (1953). Observations on the sensory physiology and behaviour of larvae of the cattle tick, *Boophilus microplus* (Can.) (Ixodidae). *Australian Journal of Zoology* 1(3):345-356.
- Willadsen P. (2006). Tick control: Thoughts on a research agenda. *Veterinary Parasitology* 138(1-2):161-168.

- Wilson R.G. (1978). Biochemical mechanisms causing tick resistance. *Journal of the South African Veterinary Association* 49(1):49-51.
- Wraight S.P., Inglis G.D., Goettel M.S. (2007). Fungi. In: Lacey L.A., Kaya H.K. (Hrsg.). *Field manual of techniques in invertebrate pathology - Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests*: 223-248. Springer, Dordrecht.
- Yamamoto I., Yabuta G., Tomizawa M., Saito T., Miyamoto T., Kagabu S. (1995). Molecular mechanism for selective toxicity of nicotinoids and neonicotinoids. *Journal of Pesticide Science* 20(1):33-40.
- Yoder J.A., Benoit J.B., Opaluch A.M. (2004). Water relations in eggs of the lone star tick, *Amblyomma americanum*, with experimental work on the capacity for water vapor absorption. *Experimental and Applied Acarology* 33(3):225-242.
- Yoder J.A., Spielman A. (1992). Differential capacity of larval deer ticks (*Ixodes dammini*) to imbibe water from subsaturated air. *Journal of Insect Physiology* 38 (11):863-869.
- Zimmermann G. (1982). Effect of high temperatures and artificial sunlight on the viability of conidia of *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 40(1):36-40.
- Zimmermann G. (1992). *Metarhizium anisopliae* - ein entomopathogener Pilz. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 45(1):113-128.
- Zimmermann G. (2007). Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Biocontrol Science and Technology* 17(9-10):879-920.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfestellung herangezogene Institutionen vollständig angegeben habe.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, September 2012

Verona Schumacher

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Verona Schumacher
Geburtsdatum: 12.07.1982
Familienstand: verheiratet

Studium

seit 03/2008 Doktorandin am Institut für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Promotionsthema: „Untersuchungen zum kombinierten Einsatz von *Metarhizium anisopliae* und niedrig dosierten insektiziden/akariziden Wirkstoffen auf die Zecken *Amblyomma hebraeum*, *Rhipicephalus sanguineus* und *Rhipicephalus microplus*“

03/2007 Beginn des Promotionsstudiums an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

10/2002 – 02/2007 Studium der Biologie an der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Thema der Diplomarbeit: „Untersuchungen zur visuellen Orientierung von Insekten an Blühstreifen“

Schulausbildung

2002 Abitur an der St. Ursula-Schule, Hannover

Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Veröffentlichungen

Schumacher V., Poehling H.-M. (2012). *In vitro* effect of pesticides on the germination, vegetative growth and conidial production of two strains of *Metarhizium anisopliae*. *Fungal Biology* 116(1):121-132.

Tagungsbeiträge

Schumacher V., Poehling H.-M. (2010). *In vitro* Wirkung von Akariziden auf zwei Stämme von *Metarhizium anisopliae*. Posterbeitrag, 57. Deutsche Pflanzenschutztagung, Berlin.

Kuchenbuch V., Meyhöfer R. (2009). Präferenz der Hainbuchen-Schwebfliege *Episyrphus balteatus* DeGeer (Diptera: Syrphidae) gegenüber verschiedenen Blütenmerkmalen mit Blick auf die Optimierung der biologischen Schädlingsbekämpfung. Vortrag, Entomologentagung, Göttingen.

Kuchenbuch V., Poehling H.-M. (2009). Control of ticks using entomopathogenic fungi and sublethal dosages of acaricides. Posterbeitrag, Entomologentagung, Göttingen.

Kuchenbuch V., Meyhöfer R. (2008). Präferenz der Hainbuchen-Schwebfliege *Episyrphus balteatus* DeGeer (Diptera: Syrphidae) gegenüber verschiedenen Blütenmerkmalen mit Blick auf die Optimierung des Einsatzes unter Glas. Vortrag, 56. Deutsche Pflanzenschutztagung, Kiel.

Danksagung

Vielen Dank an **Prof. Dr. Hans-Michael Poehling** für die Überlassung des Themas, die Betreuung und Unterstützung, die hilfreichen Hinweise und Denkanstöße sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen in die Durchführung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Dieter Steinhagen danke ich dafür, dass er sich so kurzfristig bereit erklärt hat die Aufgaben des Zweitgutachters zu übernehmen.

Für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes danke ich **Prof. Dr. Edgar Maiss**.

Ein großer Dank geht an die **Deutsche Forschungsgesellschaft (DFG)**, durch die diese Arbeit im Rahmen des trilateralen Forschungsprojektes (PO 207/34-1) gefördert wurde. Meinen Projektpartnern aus Israel und Palästina, **Rula Abu Jrais, Dana Ment, Asael Rot, Dr. Galina Gindin, Dr. Naim Iraki und Dr. Michael Samish**, danke ich für die zur Verfügung gestellten Pilzstämme aus der von Dr. Galina Gindin betreuten Sammlung entomopathogener Pilze der entomologischen Arbeitsgruppe des Volcani Centers (Bet Dagan, Israel), die netten Gespräche und für die anregenden Diskussionen.

Ein besonderer Dank gilt der **Bayer Animal Health GmbH**, die mir für die Untersuchung die verschiedenen Zeckenarten und –stadien zur Verfügung gestellt hat **und ihren Mitarbeitern**, die mir mit der Erarbeitung der Methoden behilflich waren und die für einen reibungslosen Versuchsablauf gesorgt haben. **Dr. Andreas Turberg** danke ich für die hilfreichen Anregungen und Diskussionen.

Der **Trifolio GmbH** danke ich für den zur Verfügung gestellten NeemAzal-Wirkstoff.

Birgit Milde, Yvonne Koleczek sowie den an meinem Projekt beteiligten studentischen Hilfskräften und Auszubildenden danke ich für die tatkräftige Unterstützung im Labor.

Dr. Daniel Gerhard von Institut für Biostatistik bin ich für die statistische Beratung zu Dank verpflichtet.

Dr. Rainer Meyhöfer danke ich für das offene Ohr, die netten Gespräche, die Unterstützung und die hilfreichen Tipps.

Ich danke **allen Mitarbeitern** des Instituts für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, die durch gute Gespräche und das Schaffen einer angenehmen Arbeitsatmosphäre dafür gesorgt haben, dass ich mich am Institut wohl fühlen konnte.

Danke auch an **meine Arbeitskollegen, meine Freunde und meine Familie** für euren Glauben an mich, die aufbauenden und ermahnenden Worte, euer Verständnis und eure Unterstützung in teilweise stürmischen Zeiten.