

## Zuchtmethode und semisynthetische Nährmedien für Apfelwickler

Für physiologische und pathologische Untersuchungen an *Laspeyresia pomella* [= *Carpocapsa pomonella*] sollten möglichst alle Entwicklungsstadien zur Verfügung stehen. Die früher übliche Zucht der Raupen in Äpfeln eignet sich dazu nicht. Es war daher notwendig, eine Laborzuchtmethode zu entwickeln, die es erlaubt, die Tiere zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung zu kontrollieren. Da die Einzelzucht Kannibalismus verunmöglicht und zudem einen gewissen Schutz gegen den Ausbruch von Epizootien gewährt, wurde diese Methode gewählt. Materielle Voraussetzung war die Entwicklung eines semisynthetischen Nährmediums, das nicht zu komplex und teuer ist. Ferner wurde darauf geachtet, dass die Zucht einer grossen Zahl von Raupen einen möglichst geringen Raum beanspruche.

Ausgehend von einem relativ komplexen Medium von REDFERN<sup>1</sup> wurde, durch systematische Elimination verschiedener Ingredientien, das relativ einfache Medium A entwickelt<sup>2</sup> (Tabelle). Insbesondere konnten dabei, ohne Reduktion der Aufwachsrate, des Puppengewichtes oder der Fekundität, Trockenäpfel, Walnüsse, Sojabohnenprotein, Glycin, Cystein sowie die komplexen Vitamin- und Salzmischungen weggelassen und durch Trocken-

milchpulver, einen erhöhten Hefegehalt und eine einfache Salzmischung ersetzt werden. Medium A ergab bei 29°C Aufwachsrate (L<sub>1</sub> - Falter) von 50–90%, bei einer mittleren Dauer der Larvalentwicklung von 17 Tagen<sup>2</sup>.

Da es zeitweise schwierig war, Apfelkerne in genügender Menge zu erhalten und diese zudem anfällig für Pilzinfektionen waren, wurde mit Erfolg versucht, die Kerne durch Sojaflocken zu ersetzen<sup>3</sup>, was nach Elimination des ebenfalls unnötigen Cellulosepulvers zum Medium B führte (Tabelle). Medium B hat nicht nur den Vorteil grosser Einfachheit, sondern befriedigt offenbar das Nahrungsbedürfnis der Raupen in so starkem Mass, dass diese nicht in das Medium eindringen, sondern auf der Oberfläche fressen und somit dauernd beobachtet werden können. Es scheint demnach, dass die Apfelwicklerraupe in Früchten nur deshalb bis zum Kerngehäuse vordringt, weil sie im Fruchtfleisch keine optimale (proteinreiche?) Nahrung findet.

Die Zubereitung erfolgt für beide Medien auf gleiche Weise: Die in der Tabelle aufgeführten Substanzen a) werden in die angegebene Menge kochenden Wassers geschüttet. Unter stetigem Durchmischen mit einem elektrischen Stabmixer kühlt man das Ganze im kalten Wasserbad ab. Wenn die Temperatur 60°C erreicht hat, werden die Substanzen b) zugefügt. Nach nochmaligem gutem Durchmischen wird das Medium in bereitgestellte, durchsichtige Polystyrendöschen mit quadratischer Grundfläche (23 × 23 × 20 mm; Art. Nr. 3405, Brac AG, CH-4226 Breitenbach) verteilt. Je Döschen werden 2–3 ml Medium eingefüllt. Die in der Tabelle angegebenen Mengen reichen für ca. 700 Einheiten. Man lässt die abgefüllten Döschen mit Filterpapier oder Papierhandtüchern bedeckt über Nacht stehen; dadurch wird die Mediumoberfläche frei von überschüssigem Wasser. Die Döschen werden dann sofort mit Räumchen belegt oder ohne Deckel in Polyäthylensäcke abgefüllt und nach Bedarf verwendet. Bei Zimmertemperatur bleiben die Medien in diesen Säcken mindestens eine Woche lang frisch. Bei 2°C halten sie mindestens einen Monat lang, doch müssen sie nach kühler Lagerung vor dem Ansatz an die Zimmertemperatur gut adaptiert werden, da sich sonst Kondenswasser bildet, was den Zuchterfolg vermindert.

Je Döschen wird ein frisch geschlüpftes Räumchen mit einem Pinsel auf das Medium oder eine Innenwand gebracht und jedes Döschen sofort mit dem unperforierten Deckel verschlossen. Der Deckel erlaubt einen genügend guten Gasaustausch, verhindert aber das Austrocknen des

Zusammensetzung der Medien

		Medium A	Medium B
Wasser		1000 ml	1100 ml
a) Agarpulver (g)	18	+	+
Cellulosepulver (g)	27	+	—
Apfelkerne gemahlen (g)	90	—	—
Sojaflocken (g)	120	—	+
Magermilchpulver (g)	54	+	+
Bierhefe getrocknet (g)	45	+	+
Zucker <sup>a</sup> (g)	54	+	+
Cholesterin <sup>a</sup> (g)	0,55	+	+
Cholinchlorid (g)	1,2	+	+
Salzmischung <sup>b</sup> (g)	13,5	+	+
b) 5% Ascorbinsäure in Wasser (ml)	180	+	+
Fungizidlösung <sup>c</sup> (ml)	24	+	+
Leinöl (ml)	10	+	—
4 n × KOH (ml)	14	+	—
Formol (40%) (ml)	2	—	+

<sup>a</sup> Zur Gewährleistung einer homogenen Verteilung des Cholesterins wird dieses vor der Zugabe zum Medium, zusammen mit dem Zucker, in einem elektrischen Schlagwerk (Kaffeemühle) fein pulverisiert.

<sup>b</sup> Salzmischung<sup>2</sup>: 9 g NaHCO<sub>3</sub>, 11 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12 g Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, 3,7 g MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O.

<sup>c</sup> Fungizidlösung<sup>4</sup>: 20 g Sorbinsäure und 15 g Nipagin, gelöst in 170 ml Aethanol.

<sup>1</sup> R. E. REDFERN, J. econ. Ent. 57, 607 (1964).

<sup>2</sup> J. HUBER, Diplomarbeit, Entomol. Institut, ETH Zürich (1967).

<sup>3</sup> K. SCHMID, Diplomarbeit, Entomol. Institut, ETH Zürich (1968).

<sup>4</sup> R. E. REDFERN, J. econ. Ent. 56, 240 (1963).

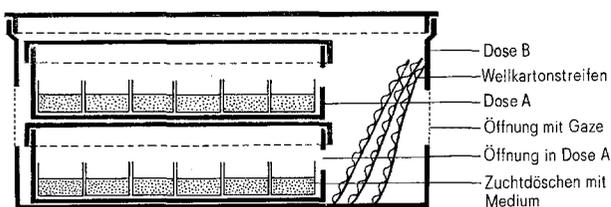


Fig. 1. Schematischer Seitenriss des Verpuppungsansatzes in ineinander geschachtelten Polystyrendosen (s. Text).

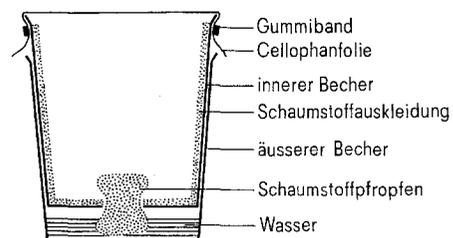


Fig. 2. Schematischer Seitenriss der Falterbecher zur Eiablage an Cellophanfolie (s. Text).

Mediums. Bis zu 100 belegte Zuchtdöschen werden in mehreren Lagen in durchsichtige Polystyrendosen (gleiches Format wie Dose B, unten) eingefüllt und bei 26°C (bis 29°C möglich) und Dauerlicht (zur Verhinderung der Diapause) inkubiert. Die Luftfeuchtigkeit in der Klimakammer spielt keine Rolle. Falls für bestimmte Versuche frisch gehäutete  $L_5$  benötigt werden, ist eine gewisse Synchronisation dadurch erreichbar, dass die Zuchtdöschen, sobald die ersten  $L_4$  kurz vor der Häutung stehen, 2–3 Tage lang auf 15°C gekühlt werden. Wenn diese Tiere auf 26°C zurückgebracht werden, häuten sich die meisten innerhalb eines halben Tages<sup>5</sup>.

Nach Ablauf von 14 Tagen (bei höherer Temperatur entsprechend früher) werden die Döschen geöffnet und in einfacher Lage in flache Polystyrendosen gelegt (140 × 75 × 35 mm; Art. Nr. 4554, Brac AG), die auf einer der Breitseiten ein Loch von ca. 10 mm Durchmesser aufweisen (Figur 1, Dose A). Die Luftfechtigkeiten in diesen Dosen wird relativ hoch, was wiederum ein stärkeres Austrocknen des Mediums verhindert.

Je 2 der Dosen A werden in eine durchsichtige Polystyrendose gelegt (190 × 90 × 80 mm; Art. Nr. 3871, Brac AG), die auf allen Seiten grosse, mit Organdi überspannte Lüftungsöffnungen besitzt (Figur 1, Dose B). In den freien Raum zwischen den Dosen A und Dose B werden 20 mm breite Streifen von Wellkarton gelegt. Die Verpuppungsdosen halten wir in einer Klimakammer von 26°C und 50% rel. Feuchtigkeit (R.H. bis 70% können toleriert werden).

Die verpuppungsbereiten Larven verhalten sich negativ hygrotaktisch und suchen trockene Verpuppungsnischen. Sie folgen daher dem abnehmenden Feuchtigkeitsgradienten durch das Loch in Dose A und verpuppen sich in den Wellkartonstreifen in Dose B.

Nachdem sich alle Larven in den Wellkartonstreifen eingesponnen und verpuppt haben, werden die Streifen in gut gelüftete Dosen gebracht oder sie werden geöffnet und die Puppen nach Geschlechtern getrennt in Joghurtbechern bei 26°C und 50–70% R.H. bis zum Schlüpfen der Falter aufbewahrt. Ein Hinauszögern des Schlüpftermins mittels tieferer Temperaturen lohnt sich in der Regel nicht, da die so behandelten Puppen oft Falter mit geringer Fertilität und Fekundität ergeben.

Die Zucht der Falter und die Eigewinnung erfolgt in Joghurtbechern, die innen mit 2 mm starkem Schaumstoff ausgekleidet sind. Der Schaumstoffbelag wird nicht angeklebt, damit er für die Reinigung leicht herausgenommen werden kann. Im Boden des Bechers befindet sich ein Loch von 15 mm Durchmesser, durch das ein Schaumstoffpfropfen (30 × 20 mm) eingezogen ist. Er dient den Faltern als Tränke und ragt in einen darunter geschachtelten zweiten Joghurtbecher, der ca. 10 mm

hoch mit Wasser gefüllt ist. Statt Wasser kann auch 10%ige Saccharoselösung mit 0,3% Sorbinsäure verwendet werden, was bei gewissen Stämmen von *L. pomonella* die Fekundität erhöht. Die obere Öffnung der Zuchtbecher wird mit einer Cellophanfolie verschlossen, die von einem Gummiband festgehalten wird (Figur 2). Durch die Schaumstoffauskleidung der Becher wird erreicht, dass praktisch alle Eier auf die glatte Cellophanfolie abgelegt werden, die je nach Bedarf gewechselt werden kann.

Je Zuchtbecher werden 1–2 Falterpaare angesetzt. Wir halten die Becher in einer Glashaushaltskabine bei 26–28°C, 80–90% R.H. und natürlicher Abenddämmerung. Hohe Luftfeuchtigkeit ist notwendig, damit die Eier auf der Cellophanfolie nicht austrocknen; hingegen ist Dämmung nicht notwendig für den Zuchterfolg<sup>2</sup>.

Für die fortlaufenden Zuchten lassen wir die Eierfolien auf den Falterbechern, bis die ersten Embryonen das Schwarzkopfstadium erreicht haben. Falls hingegen genau datierte Eier benötigt werden, wechselt man die Folien täglich. Sie werden samt den Eiern in einer 10%igen Formalinlösung während 2–3 min desinfiziert, mit dest. Wasser gut gespült und hierauf soweit getrocknet, bis kein freies Wasser mehr sichtbar ist. Die nicht vollkommen trockenen Eierfolien werden dann locker in Polystyrendosen (Typ B) geschichtet und diese, zusammen mit einem Ballen nassen Filterpapiers, in Polyäthylensäcke eingeschlossen. Falls das Schlüpfen der Eiräupchen verzögert werden soll, werden die Eier bis zu 7 Tage bei 13°C aufbewahrt, sonst bei 26°C. Die geschlüpften Räumchen müssen täglich mindestens einmal abgelesen und auf Nährmedium angesetzt werden.

Nach der oben beschriebenen Methode wurden an unserem Institut bisher mehr als 30 fortlaufende Generationen von *L. pomonella* gezüchtet, wobei durchschnittliche Aufwuchsraten vom  $L_1$  bis zur Puppe von 70–80% erreicht werden.

*Summary.* A method for the individual rearing of the codling moth *Laspeyresia pomonella* is described. The method allows the collection of exactly dated eggs and the rearing of a large number of larvae in a small space. By using the second medium described, it is possible to watch all developmental stages at any time without disturbing them. The average larval survival rate is 70–80%.

J. HUBER, G. BENZ UND KÄTHE SCHMID

*Entomologisches Institut, Eidg. Technische Hochschule Zürich, CH-8006 Zürich (Schweiz), 8. Juni 1972.*

<sup>5</sup> R. WÄGER, persönl. Mitteilung.

## Properties of Hexokinase Bound to Glass

It has been shown previously<sup>1</sup> that hexokinase in solution is capable of effecting the phosphorylation of the D-glucose and D-fructose present in formose sugars. In order to operate continuously, it would be desirable to utilize the enzyme bound to an insoluble support. We present here some of our results with hexokinase bound to glass.

Previous reports<sup>2–4</sup> have described the covalent attachment of several enzymes to porous glass. The procedure used here for hexokinase is as follows: Porous 96% silica

glass particles (Corning Glass Works, Corning, N.Y.), 40–60 mesh, pore diameter  $55 \pm 4.4$   $\mu$ m, pore volume 1.4 ml/g, were cleaned in boiling 5% HNO<sub>3</sub> in an ultrasonic bath, washed with water and dried at 150°C. A silyl derivative was prepared<sup>5</sup> by refluxing with 10%  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane in toluene. The product was reacted with *p*-nitrobenzoyl chloride and the aryl nitro group was subsequently reduced<sup>6</sup> to an amino group. Binding of yeast hexokinase (Gallard-Schlesinger Co., Long Island,