

Untersuchungen zu genetischen Unterschieden differenzierter Paarungszeit zweier Stämme des Herbst-Heerwurms

Bachelorarbeit

vorgelegt an der Ernst-Abbe-Hochschule Jena
Fachbereich Medizintechnik und Biotechnologie

Hochschulbetreuer: Prof. Dr. Munder

Betriebliche Betreuerin: Dr. Hänniger

Institut: Max-Planck-Institut für chemische Ökologie

Bearbeitet von: André Michael Richter

Matrikelnummer: 642771

Biotechnologie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
2 Material und Methoden.....	4
2. 1 Insektenzucht.....	4
2. 2 Schlupfzeitpunkt	5
2. 3 Paarungsbeobachtungen.....	5
2. 4 DNA-Extraktion.....	5
2. 5 Sequenzierung der Promotorregion von <i>vriIle</i>	6
3 Ergebnisse.....	9
3. 1 Schlupfzeitpunkt	9
3. 2 Paarungsbeginn	9
3. 3 Paarungsdauer	12
3. 4 Eiablageverhalten.....	13
3. 5 Stammdiagnose	15
3. 6 Sequenzierung der Promotorregion von <i>vriIle</i>	15
4 Diskussion.....	19
4. 1 Schlupfzeitpunkt	19
4. 2 Paarungsbeginn	19
4. 3 Paarungsdauer	21
4. 4 Eiablageverhalten.....	21
4. 5 Stammdiagnose	22
4. 6 Sequenzierung der Promotorregion von <i>vriIle</i>	22
5 Zusammenfassung	24
Quellen.....	25

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Vergleich des Schlupfzeitpunkts des Mais- (gelb) und Reisstamms (blau) von <i>Spodoptera frugiperda</i> während der Dunkelphase.	9
Abbildung 2 Beginn der ersten Kopulationen in beiden Stämmen. Die Stapelhöhen entsprechen der kumulativen Anzahl der Paarungen innerhalb der Dunkelphase, die Scheiben in jedem Stapel der tatsächlichen Anzahl beobachteter Paarungen zum jeweiligen Zeitpunkt. Signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen werden durch Sternchen angegeben: ***P < 0,0001).	10
Abbildung 3 Vergleich des Kopulationsbeginns von Paaren beider Stämme des <i>S. frugiperda</i> , die sich in der ersten Nacht (Mais1, Reis1) oder der zweiten Nacht (Mais2, Reis2) zum ersten Mal paarten. Verschiedene Buchstaben indizieren signifikante Unterschiede (Student's T-test, gleicher Buchstabe: P > 0,05).	11
Abbildung 4 Vergleich des Beginns der ersten und zweiten Kopulation im Mais- und im Reisstamm des <i>S. frugiperda</i> . Verschiedene Buchstaben indizieren signifikante Unterschiede (Student's T-test, unterschiedlicher Buchstabe: P < 0,05).	12
Abbildung 5 Dauer der beobachteten individuellen Paarungen beider <i>S. frugiperda</i> Stämme während der ersten (MAIS 1. KOP, REIS 1. KOP) und zweiten Kopulation (MAIS 2. KOP, REIS 2. KOP). Verschiedene Buchstaben indizieren signifikante Unterschiede (Student's T-test, gleicher Buchstabe: P > 0,05).	13
Abbildung 6 Ovipositionszeitpunkte der beiden <i>S. frugiperda</i> Stämme in der zweiten Beobachtungsnacht (n.s. = nicht signifikant).	14
Abbildung 7 Zeitraum vom Ende der ersten Kopulation bis zum Beginn der ersten Eiablage in beiden <i>S. frugiperda</i> Stämmen (Student's T-test, *P < 0,01).	14
Abbildung 8 Struktur des Gens <i>vrlle</i> . Gezeigt werden die Positionen der Amplikons (1-8) und der E-box-Elemente (A-K) der beiden <i>Spodoptera frugiperda</i> Stämme (Maisstamm in Braun-, Reisstamm in Blautönen). Dunklere Farbtöne repräsentieren eine höhere Abdeckung durch individuelle Sequenzen, hellere Töne eine geringere Abdeckung. Die Position (Höhe) der Amplikons ist nach dieser Abdeckung geordnet. Ein Amplikon-Farbsegment entspricht etwa 200 bp.	17
Abbildung 9 Vergrößerte Intronsequenzabschnitte mit den dazugehörigen Positionen der E-boxen A, K und I. Im Bereich der E-box I wurde ein stammspezifischer Polymorphismus W6714 des <i>S. frugiperda</i> gefunden.	18

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Pintobohnendiätzusammensetzung	4
Tabelle 2 Probenbezeichnungen für die DNA-Extraktionen. Die Abkürzungen "E" und " L" stehen für die englischen Worte early und late, das "C" und "R" für den Mais- bzw. Reisstamm und das "f" für weiblich.	6
Tabelle 3 Primerpaare, Amplikons und deren Eigenschaften.....	7
Tabelle 4 Bedingungen für die PCR-Reaktionen	8
Tabelle 5 Stammdiagnostizierende Sequenzabfolgen der beiden Marker in zwei <i>S. frugiperda</i> Stämmen mit der entsprechend abgedeckten Anzahl an Individuen	15

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
C	Mais
CDS.....	proteincodierende Region
clock.....	circadian locomotor output cycles kaput
E-box.....	enhancer Box
Intron.....	intragenic region
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
L:D	Licht:Dunkelheit
R	Reis
SNP	single nucleotid polymorphism
UTR	untranslierte Region

1 Einleitung

Die Artbildung stellt einen komplexen evolutionären Mechanismus dar, der zur biologischen Vielfalt beiträgt. Vier Formen werden unterschieden: die allopatrische (geographische Isolation), sympatrische, parapatrische und peripatrische Artbildung. Wenn zwei oder mehr Populationen einer Art im selben geographischen Gebiet vorkommen und ein Genfluss zwischen ihnen möglich ist, wird dies als Sympatrie bezeichnet. Um diesen Genfluss einzuschränken oder zu verhindern, müssen Reproduktionsbarrieren vorliegen. Es wird zwischen präzygotischen Barrieren, wie mechanische oder zeitliche Isolation und postzygotischen Barrieren, wie Hybridsterblichkeit oder -sterilität, unterschieden. Die Effekte dieser Barrieren können in ihrer Intensität variieren. Während einige Barrieren allein schwache isolierende Wirkungen zeigen, können sie in Kombination eine stärkere Trennung von Populationen bewirken. Für diesen Prozess wurde der Begriff des „coupling“ vorgeschlagen (Butlin and Smadja 2018).

Der Herbst-Heerwurm (fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) (Lepidoptera: Noctuidae)) ist ein interessanter Versuchsorganismus, um Einblicke in die Entwicklung von Reproduktionsbarrieren zu erhalten, die zur Artbildung führen können. Es handelt sich um eine generalistische Motte, die ursprünglich aus Nord- und Südamerika stammt. Diese zählt zu den invasiven Arten und verursacht in mehreren Kontinenten erhebliche Schäden an Kulturpflanzen (Goergen et al. 2016; Wu et al. 2019; Banson et al. 2020; Kenis et al. 2023). In Afrika wurden die durch diesen Schädling verursachten Ertragsverluste auf über 9 Mrd. USD geschätzt (Eschen et al. 2021).

In dieser Art wurden zwei morphologische Stämme identifiziert, die nach ihrer Präferenz für Wirtspflanzen benannt sind: der sogenannte Mais- (corn-strain, „C“) und der Reisstamm (rice-strain, „R“). C präferiert vor allem Mais, Sorghum und Baumwolle, wohingegen R Reis und kurze Wildgräser bevorzugt. Beide Stämme weisen differenzierte phänotypische und genotypische Eigenschaften auf. Die Unterscheidung der beiden Stämme basiert auf molekularen Markern in der mitochondrialen und nuklearen DNA (Pashley 1986; Meagher and Gallo-Meagher 2003; Nagoshi 2010; Nagoshi 2012). Die phänotypischen Unterschiede wurden in der Futterpflanzenwahl, im Sexualverhalten und im nächtlichen Reproduktionszeitpunkt festgestellt. Durch Feldexperimente und anschließender genetischer Analyse wurde dokumentiert, dass beide Stämme im gleichen geographischen Habitat vorkommen können und der Hybridisierungsgrad circa 16 % beträgt (Prowell et al. 2004). Ob es sich bei den Stämmen um bereits entwickelte Arten handelt und welche Faktoren diese voneinander isolieren, bleibt Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion (Juárez et al. 2014; Dumas et al. 2015). Da die Verbreitung der Stämme in neuen invasiven Gebieten nicht vollständig entschlüsselt ist, fokussiert diese Arbeit Populationen mit Ursprung in Florida.

Im folgenden Abschnitt werden drei der vermutlich wirkenden Barrieren vorgestellt.

Eine treibende Kraft für sympatrische Artbildung stellt die Wirtspflanzenpräferenz dar. Hierbei entwickeln sich Populationen auf unterschiedlichen Pflanzenarten und nutzen diese als Nahrungsquelle und/oder Fortpflanzungsort. Die Voraussetzungen für eine Artbildung über Wirtspflanzenwahl setzen sich aus einer Kombination von Nischenbildung, genetischer Divergenz und reproduktiver Isolation zusammen (Rundle and Nosil 2005). Bei der

Apfelfruchtfliege (*Rhagoletis pomonella*) wurde bereits vor 150 Jahren beobachtet, dass sich zwei verschiedene Varianten entwickelt hatten. Dies basierte auf dem Wechsel von heimischem Weißdorn (*Crataegus*) zu eingeführten Äpfeln (*Malus pumila*), in den Vereinigten Staaten von Amerika (Walsh 1864, 1867). Ein Jahrhundert später wurden diese Arbeiten aufgegriffen und *R. pomonella* als Beispiel für sympatrische Artbildung vorgeschlagen (Bush 1969). Diese Hypothese wurde durch den Nachweis genetischer Differenzierung zwischen den Wirtsrassen gestützt (Feder et al. 1988). Bei *S. frugiperda* fehlen bislang konsistente phänotypische und reproduzierbare Unterschiede in der Präferenz und Leistung der Larven. Bisherige Studien zeigten nur wenige signifikante Unterschiede in der Eiablagepräferenz der Weibchen (Meagher et al. 2011). Das Auftreten beider Stämme auf vielen verschiedenen Futterpflanzen widerspricht der Annahme, dass es sich bei der Wirtspflanzenpräferenz um eine starke Isolationsbarriere handelt. Insbesondere, da bislang keine Assoziation zwischen Futterpflanzen und Paarungsorten beschrieben wurde. Insgesamt wird die Wirtspflanzenpräferenz als eine Barriere mit geringer isolierender Wirkung bei *S. frugiperda* angesehen (Hänniger 2015).

Ein weiterer potenzieller Faktor für sympatrische Divergenz sind Unterschiede in der Sexualkommunikation. Bei einem Vertreter der Lepidoptera (*Ostrinia nubilalis* (Hübner)) wurden divergente Entwicklungen über die Zusammensetzung der Sexualpheromone beschrieben. Dies resultierte in der Einteilung in zwei Pheromonstämme, bei denen die Weibchen ihre Mischung in entgegengesetzten Verhältnissen emittieren (Smadja and Butlin 2009; Lassance et al. 2010). Die Zweikomponentenmischung besteht aus E- und Z-Isomeren, welche namensgebend für den E- und Z-Stamm sind (Kochansky et al. 1975). Die unterschiedlichen Verhältnisse von E/Z-11-Tetradecenylacetat beruhen auf stammspezifischen Varianzen im Fettsäure-Reduktase-Gen (*pgfar*), die verschiedene Substratspezifitäten des Enzyms verursachen (Coates et al. 2019). Die Männchen zeigen eine erhöhte Anziehung zu den Mischungen der Weibchen ihres Stammes und reagieren weniger auf die der anderen. Die Kombination aus weiblicher Pheromonvariation und der spezifischen Reaktion der Männchen wirken zusammen als Isolationsbarriere, welche den Genfluss und die Hybridisierung zwischen den Stämmen verringert. Bei *S. frugiperda* wurden stammspezifische Unterschiede in der weiblichen Sexualpheromonzusammensetzung beobachtet (Unbehend et al. 2013). Windkanaltests zeigten keine einheitliche stammspezifische Anziehung der Männchen. Jedoch wurden die Männchen von flüchtigen, habitatspezifischen Verbindungen beeinflusst. Außerdem zeigten C-Männchen eine stärkere Anziehung für niedrigere Konzentrationen des Pheromons Z7-12:OAc, welches von den Weibchen dieses Stammes in geringeren Mengen produziert wird. In Summe wurden die Unterschiede in der Sexualkommunikation als marginal bewertet, sodass diese ebenso als schwache Barriere zu betrachten sind.

Wie zuvor erläutert, wurden stammspezifische Abweichungen im Zeitpunkt der Paarung beobachtet. Konsistente Paarungszeitunterschiede deuten auf allochronische Divergenz hin. Dieser Mechanismus wurde für andere Insektenarten wie *Drosophila* (Tauber et al. 2003), Käfer (*Exapion* (Barat et al. 2007)), Zikaden (*Magicicada* (Sota et al. 2013)) und Mosquitos (*Anopheles gambiae* (Rund et al. 2012)) beschrieben. Bei Letzteren entwickelten sich aufgrund von stammes- und geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Tagesaktivität zwei Stämme, „M“ und „S“. Die Bezeichnungen basieren auf den Regionen Mopti und Savanne (Lanzaro et al. 1998). Infolgedessen begannen die Fortpflanzungsaktivitäten der M-

Form und S-Form zu unterschiedlichen Zeitpunkten, wodurch die Genflussrate zwischen den Stämmen abnahm. Im Laufe der Zeit konnten genetische Unterschiede zwischen den Stämmen akkumulieren. Bei *S. frugiperda* nimmt C die Kopulation signifikant früher als R auf (Pashley et al. 1992; Schöfl et al. 2009). Dennoch wurden Überlappungen im Zeitfenster der Fortpflanzungsaktivität zwischen den Stämmen beobachtet (Schöfl et al. 2009). Sander van Doorn et al. (in prep) zeigten durch ein mathematisches Modell, dass Zeitunterschiede in der Paarung allein nicht ausreichen, um zwei Populationen dauerhaft zu separieren. Die Aufrechterhaltung der stammspezifischen Paarungszeitunterschiede kann jedoch vorliegen, wenn zusätzlich geschlechtsspezifische Expressionsunterschiede angenommen werden.

Hänniger et al. (2017) gelang es bei *S. frugiperda* ein QTL-Chromosom (quantitative trait locus) zu identifizieren, auf dem das Gen *vriille* lokalisiert wurde. Dieses Gen ist Teil des regulatorischen Feedback-Loops der circadianen Uhr bei Insekten (Hardin 2005). Es wurde festgestellt, dass stammspezifische Expressions- und Sequenzunterschiede in der Promotorregion des Gens bei *S. frugiperda* vorlagen. Somit könnten Polymorphismen in *vriille* den stammspezifischen Paarungsbeginn beeinflussen und hätten einen Anteil an der Isolation der beiden Stämme.

In dieser Arbeit wurden die Schlupfzeitpunkte von Faltern beider Stämme beobachtet. Zur Bestätigung der Annahme, dass die Laborpopulationen divergente Paarungszeiten aufweisen, erfolgten über zwei Nächte hinweg Beobachtungen von Paarungen und Eiablagen. Während der unterschiedliche Paarungsbeginn zwischen den Stämmen beobachtet wurde, zeigten die Stämme keine Differenz im Schlupfzeitpunkt. Dies stellt einen Unterschied in der circadianen Uhr in Frage oder ist die Folge von Kontamination bzw. Durchmischung der beiden Stämme. Die circadiane Uhr ist ein internes Zeitregulierungssystem, welches eine entscheidende Rolle bei der Steuerung physiologischer und verhaltensbezogener Rhythmen von Organismen hat. Um Kontaminationen identifizieren zu können, wurden einzelne Individuen mit unterschiedlichen Paarungszeitpunkten auf stammdiagnostizierende Marker untersucht. Zusätzlich wurden diese ausgewählt um die DNA-Sequenzen der Promotorregion von *vriille* miteinander zu vergleichen und diese mit den Beobachtungsdaten zu korrelieren. Sequenzunterschiede in dieser Region können für Expressionsunterschiede verantwortlich sein, wie sie für *vriille* beschrieben wurden (Hänniger et al. 2017). Dies setzt allerdings voraus, dass sie in allen Populationen, die sich in der Expression des Gens unterscheiden, vorhanden sind. Der Fokus des Vergleichs lag also darauf, die bereits von Hänniger et al. (2017) beschriebenen Sequenzunterschiede wiederzufinden. Das Fehlen konsistenter Unterschiede würde eine Beteiligung von *vriille* an der Divergenz der beiden Stämme falsifizieren.

In dieser Arbeit wurden die Verhaltensmuster und die DNA-Sequenzen der beiden *S. frugiperda* Stämme miteinander verglichen, um die genetischen Grundlagen ihrer differenzierten Paarungszeit zu untersuchen. Die Promotorregion des Gens *vriille* wurde sequenziert, um die mögliche Beteiligung dieser Region an der Paarungszeitdifferenzierung näher zu betrachten.

2 Material und Methoden

2. 1 Insektenzucht

Die für die DNA-Extraktionen und Beobachtungen verwendeten Populationen des Herbst-Heerwurms wurden im September 2018 in der Nähe von Citra (Florida, USA) in einem Maisfeld (C-Stamm) beziehungsweise im Januar 2019 in Weidegras (R-Stamm) nahe Ona (Florida, USA) als Larven gesammelt und an das Max-Planck-Institut für chemische Ökologie gesendet, wo sie seitdem wie folgt gezüchtet werden. Zufällige Einzelpaare werden in Paarungsbechern (Kaffeebecher, 8 oz) zusammengesetzt und mit 10%igem Honigwasser auf einem Wattebausch in einem kleineren Becher versorgt. Der Paarungsbecher wird mit einer Gardine zur Eiablage bedeckt und verschlossen. Befruchtete Eier werden auf Petrischalen mit Pintobohnenfutter überführt. Das Pintobohnenfutter (Tab. 1) stellt die einzige Nahrung für die Larven der Laborpopulationen dar, obwohl Kannibalismus nicht auszuschließen ist. Sobald die Larven groß genug sind (ca. drittes Larvenstadium), werden sie von den Petrischalen in 40 ml Plastikbecher mit Pintobohnenfutter vereinzelt. Die Tiere werden in Klimakammern bei 26 °C, 55 % relativer Luftfeuchte und Licht:Dunkelheit (L:D) 14:10 gehalten. Der L:D Zyklus wurde verschoben, sodass eine Beobachtung während der subjektiven Nacht der Insekten zwischen 12:00 und 22:00 Uhr möglich war. Puppen werden aus dem Futter geholt und verbleiben bis zum Schlupf im selben Plastikbecher. Geschlüpfte Tiere werden mit einem Watteröllchen mit Wasser versorgt und bei 14 °C und ebenfalls verschobenem L:D Zyklus gehalten, bis genügend Individuen für Paarungen geschlüpft sind (in der Regel mindestens 75 % der Puppen). Der Zyklus beginnt mit zufälligen Einzelpaarungen (zum Vermeiden von Inzucht) erneut. Die für die Observation und Sequenzierung untersuchten Falter wurden 31 (Maisstamm) respektive 30 (Reisstamm) Generationen lang im Labor aufgezogen.

Tabelle 1 Pintobohnendiätzusammensetzung

Menge	Zutaten
125 g	Pintobohnenmehl
100 g	Weizenmehl
50 g	Casein
50 g	Soja-Protein
62,5 g	Torulahefe
6 g	Ascorbinsäure
5 g	Methyl-Paraben
3 g	Sorbinsäure
2 l	Wasser dest.
10 g	Vanderzant Vitamin Mixture
250 mg	Tetracyclin
35 g	Agar-Agar, Kobe I

2. 2 Schlupfzeitpunkt

Ein Phänotyp wie die Paarungszeit benötigt immer zwei Tiere, was nachteilig für genetische Studien ist. Auf der Suche nach einem Phänotyp, der auch in einzelnen Individuen zeitliche Unterschiede zeigt, wurde der Schlupfzeitpunkt der Falter aus den Puppen beobachtet. Larven und Puppen wurden unter den gleichen Bedingungen, wie in der Insektenzucht (siehe Abschnitt 2. 1) erläutert, gehalten: Vereinzelung, 14:10 L:D Zeitregime, 26 °C, 55 % Luftfeuchte, Pintobohnendiät. 300 Puppen pro Stamm wurden ab 30 min vor Eintreten der Dunkelheit bis zum Ende der Dunkelphase halbstündig beobachtet. Währenddessen wurde der Schlupfzeitpunkt und das Geschlecht jedes Falters bestimmt. Nach zwei Tagen waren in beiden Stämmen > 100 Falter geschlüpft und die Beobachtung wurde abgeschlossen.

2. 3 Paarungsbeobachtungen

Um die nächtlichen Verhaltensweisen der Populationen zu untersuchen, wurden Paare beobachtet, wie in Schöfl et al. (2009) beschrieben. Zusammengefasst wurden Einzelpaare in durchsichtigen Plastikbechern (16 oz) zusammengesetzt und mit Honigwasser (siehe Abschnitt 2. 1) versorgt. An zwei aufeinanderfolgenden Tagen wurde halbstündlich das Kopulations- und Ovipositionsverhalten der Paare in der Dunkelphase beobachtet. Eine einzelne Beobachtungsrunde dauerte zwischen 12-15 min. Dabei wurden jeweils 100 Paarungen pro Stamm randomisiert aufgestellt, sodass diese vom Beobachter zum Zeitpunkt der Datenaufnahme nicht dem jeweiligen Stamm zugeordnet werden konnten. Der Beobachter nutzte eine Rotlichtlampe, um die Tiere nicht in ihrer subjektiven Nacht zu stören und nahm die Paarungen und Ovipositionen mittels Diktiergerät (Olympus Voice recorder WS-853 (OM Digital Solutions GmbH, Hamburg, Deutschland)) auf. Nach Brehm et al. (2021) sind Lichtquellen mit schwacher Intensität und langwelliger Strahlung zu verwenden, da Nachtfalter von Blauanteilen und ultravioletten Licht angezogen werden. In Microsoft Excel (Version 2016) wurden die Daten gebündelt, die Veranschaulichung durch Graphen erfolgte mit der Software Sigmaplot Version 14.0 (Systat Software, San Jose, CA, USA). Die Beobachtungsdaten wurden mittels Student's T-test auf signifikante Unterschiede hin verglichen.

2. 4 DNA-Extraktion

Um die Promotorregion des Gens *vrille* zu untersuchen, wurde DNA von 24 Weibchen (zwölf Mais-Stamm, zwölf Reis-Stamm) aus dem Beobachtungsexperiment extrahiert (Tab. 2). Die DNA-Extraktionen erfolgten wie in Hänniger et al. (2020) und werden nachfolgend detailliert beschrieben. Von jedem Individuum wurde ein Bein mit jeweils zwei Metallperlen und 300 µl einer 10%igen Chelexlösung (Chelex® 100 Resin (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)) in racked collection microtubes (*QIAGEN GmbH*, Hilden, Germany) gegeben, verschlossen und im Tissuelyser II (s.o.) vier min bei 30 Hz homogenisiert. Im selben Gewebelysierer wie zuvor beschrieben, wurden die Beine für vier min bei 30 Hz aufgeschlossen. Anschließend wurden die Proben für 30 min bei 95 °C und 300 U min⁻¹ inkubiert und über Nacht bei -20 °C eingefroren. Im Anschluss wurden die Proben 30 min bei 4000 U min⁻¹ zentrifugiert und dabei aufgetaut. Der Überstand wurde durch einen Deep-Well Plattenfilter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) in eine

96 Deep-Well Platte (Collection Plates, epicentre (an Illumina company), Wisconsin, USA) gefiltert und für anschließende PCRs genutzt.

Tabelle 2 Probenbezeichnungen für die DNA-Extraktionen. Die Abkürzungen "E" und "L" stehen für die englischen Worte early und late, das "C" und "R" für den Mais- bzw. Reisstamm und das "f" für weiblich.

Bechernummer	Stamm	Probenbezeichnung
5	COBS	ECf5
10	COBS	ECf10
22	COBS	LCf22
38	COBS	ECf38
41	COBS	LCf41
42	COBS	LCf42
46	ONA	LRf46
52	ONA	LRf52
55	COBS	LCf55
62	ONA	LRf62
75	COBS	LCf75
96	ONA	LRf96
98	ONA	ERf98
100	ONA	LRf100
114	ONA	ERf114
116	ONA	LRf116
122	COBS	ECf122
147	ONA	ERf147
148	ONA	ERf148
172	COBS	ECf172
174	ONA	LRf174
194	ONA	ERf194
198	COBS	ECf198
200	COBS	LCf200

2. 5 Sequenzierung der Promotorregion von *vriIle*

Die zu amplifizierende Region von ca. 7 500 bp (Basenpaaren) wurde aus in-house Gensequenzen der beiden Stämme entnommen und in Sequencher (Sequencher® Version 5.4.6 DNA sequence analysis software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA) angeglichen. Acht Primer-Paare wurden mit Hilfe der Browsersoftware Primer3web Version 4.1.0 (<https://primer3.ut.ee/>; (Untergasser et al. 2012)) in Regionen erstellt, die in den in-house Sequenzen identisch zwischen den Stämmen waren. PCR-Produkte waren zwischen 1000-1200 bp lang (Tab. 3). Die Primer wurden bei Metabion (metabion international AG, Planegg, Germany) synthetisiert und durch Entsalzung aufgereinigt. Die Sequenzen wurden in Sequencher mit den in-house Sequenzen angeglichen, gesäubert und verglichen. Dabei wurde ersichtlich, dass die Amplikonlängen der Individuen variieren können.

Des Weiteren wurde ein Fragment der Triosephosphatisomerase (*tpi*) und ein Fragment des Cytochromoxidase 1 (*coI*) amplifiziert. Beide Gene weisen stammspezifische Unterschiede

auf und die Fragmente werden standardmäßig zur Stammidentifizierung genutzt (Nagoshi et al. 2006; Nagoshi 2012).

Das Cytochromoxidase-Fragment wurde auch amplifiziert, um die extrahierte DNA auf ihre PCR-Fähigkeit zu testen. Hierzu wurde eine PCR-Reaktion angesetzt und das Fragment amplifiziert (Tab. 4). Die PCR Produkte wurden auf ein 1,5%iges Agarosegel (SeaKem LE Agarose, Lonza, Rockland, ME USA) aufgetragen und liefen für ca. 40 min bei 120 V. Die Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht (GeneGenius 2 Gel Doc System, Syngene, Cambridge, UK).

Die Fragmente der *vriI* Promotorregion, *tpi*- und *col*-Fragmente wurden auf gleiche Weise amplifiziert und wurden in-house Sanger-sequenziert.

Tabelle 3 Primerpaare, Amplikons und deren Eigenschaften

Gen	Primernamen	Sequenz 5'-3'	Primerlänge	T _m (°C)	GC-Gehalt	Amplikonlänge
<i>vriI</i>	<i>vriI</i> -UTR-F1	CGCAGTGGATATTTTC GTCATACA	23 bp	61	43 %	1186 bp
	<i>vriI</i> -UTR-R1	GCGCAACTTACGAC ACCAA	19 bp	57	53 %	
<i>vriI</i>	<i>vriI</i> -UTR-F2	AACTTCTCAATGTCG GCCCT	20 bp	58	50 %	1059 bp
	<i>vriI</i> -UTR-R2	TCGTTGAACCTTCGC CATT	20 bp	56	45 %	
<i>vriI</i>	<i>vriI</i> -UTR-F3	ACCGACTGCAATAC AACGTG	20 bp	58	50 %	1045 bp
	<i>vriI</i> -UTR-R3	GCGAGTGTTTTGTTC CGAGA	20 bp	58	50 %	
<i>vriI</i>	<i>vriI</i> -UTR-F4	TCCCCGTGAGTCAGA AATGA	20 bp	58	50 %	1132 bp
	<i>vriI</i> -UTR-R4	ACAGCGGTCTTGACC TTAGT	20 bp	58	50 %	
<i>vriI</i>	<i>vriI</i> -UTR-F5	AATCAAATATGGCG GCCGTC	20 bp	58	50 %	1138 bp
	<i>vriI</i> -UTR-R5	CGTAACAAAGTGAC TAGTGAGGT	23 bp	61	43 %	
<i>vriI</i>	<i>vriI</i> -UTR-F6	AGATAGAACTTTGTA CAATGACTCAGT	27 bp	62	33 %	1190 bp
	<i>vriI</i> -UTR-R6	AATGTTACCGCCCGT TATGC	20 bp	58	50 %	
<i>vriI</i>	<i>vriI</i> -UTR-F7	ATGAGTTGCAAAGA GGACGC	20 bp	58	50 %	1164 bp
	<i>vriI</i> -UTR-R7	GATAACACGCGGTC TGAAGG	20 bp	60	55 %	
<i>vriI</i>	<i>vriI</i> -UTR-F8	TAAATCTCGAAGCTG GCCGA	20 bp	58	50 %	1192 bp
	<i>vriI</i> -UTR-R8	GGGTCCGCACGAAT TATCAC	20 bp	60	55 %	

Gen	Primername	Sequenz 5'-3'	Primerlänge	T _m (°C)	GC-Gehalt	Amplikonlänge
<i>col</i>	CO1-58	GGAATTTGAGCAGG AATAGTAGG	23 bp	61	43%	589 bp
<i>col</i>	JM77	ATCACCTCCWCCTG CAGGATC	21 bp	63	57%	
<i>tpi</i>	<i>tpi-msp1-RFLP-F1</i>	GGTTGCCCATGCTCT TGAGTCCGGACTGA AGG	32 bp	77	59%	556 bp
<i>tpi</i>	<i>tpi-msp1-RFLP-R2</i>	CAGTCACTGACCCAC CATACTG	22 bp	64	55%	

Tabelle 4 Bedingungen für die PCR-Reaktionen

PCR-Komponenten ¹		PCR-Programm		
3 µl	DNA	2 min		94 °C
10,9 µl	H ₂ O dest.			
0,1 µl	Taq-Polymerase ¹			
2 µl	2,5 mM dNTPs ¹	35 x	45 s	94 °C
2 µl	Taq-Puffer ²		1 min	54 °C
1 µl	10 mM Primer- Forward ¹		1,5 min	72 °C
1 µl	10 mM Primer-Reverse ¹	10 min		72 °C

¹Metabion, Martinsried bzw. Planegg, Deutschland; ²Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

3 Ergebnisse

3.1 Schlupfzeitpunkt

Die beobachteten Stämme von *S. frugiperda* zeigten keinerlei Differenzierung der Schlupfzeiten (Abb. 1). Bei beiden Stämmen schlüpfte der Großteil der Falter innerhalb der ersten 1,5 h der Dunkelheit. Auch über den Rest der Nacht zeigten die beiden Stämme keine Unterschiede in der Anzahl der schlüpfenden Falter je Zeitpunkt.

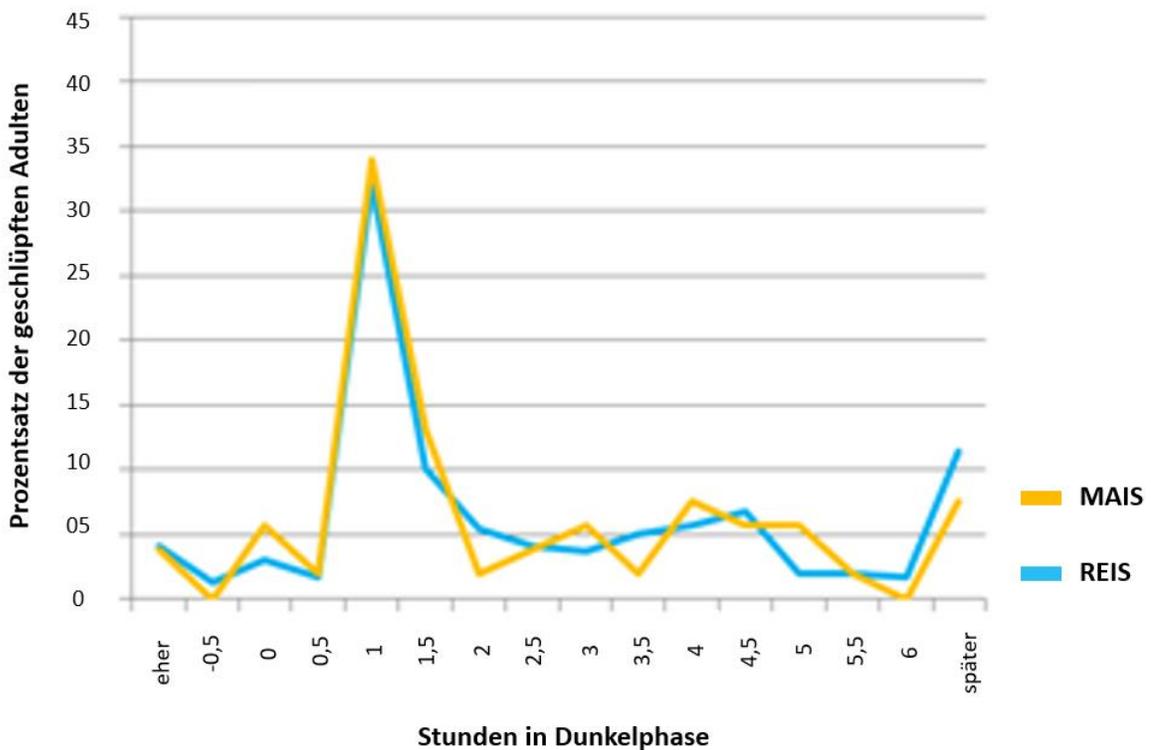


Abbildung 1 Vergleich des Schlupfzeitpunkts des Mais- (gelb) und Reisstamms (blau) von *S. frugiperda* während der Dunkelphase.

3.2 Paarungsbeginn

Es wurden 100 Paare je Stamm beobachtet. In der ersten Nacht paarten sich im C-Stamm 81 und im R-Stamm 95 Paare. In der zweiten Nacht wurden 69 Paarungen im C-Stamm und 66 im R-Stamm bestimmt. Der R-Stamm zeigte einen stärkeren Rückgang der Paarungen von der ersten zur zweiten Nacht. Der Paarungsbeginn fand durchschnittlich nach 2,87 h (C) respektive 6,45 h (R) statt und unterschied sich zwischen den Stämmen signifikant (Abb. 2). Die stammspezifischen Maxima des Paarungsbeginns lagen bei 0,5 h für den C-Stamm und bei 6,5 h für den R-Stamm. 95 % des C-Stamms paarten sich in den ersten sechs Stunden, während 88 % des R-Stamms nach vier Stunden begannen. Kopulationen des C-Stamms

begannen tendenziell früher und lagen in einem Zeitraum zwischen 0,5-9 h vor. Paarungen des R-Stamms wurden, bis auf zwei Zeitpunkte (3 und 9 h), zu jedem Beobachtungszeitpunkt beobachtet.

In beiden Stämmen lag jeweils ein Pärchen mit permanenter Begattung vor.

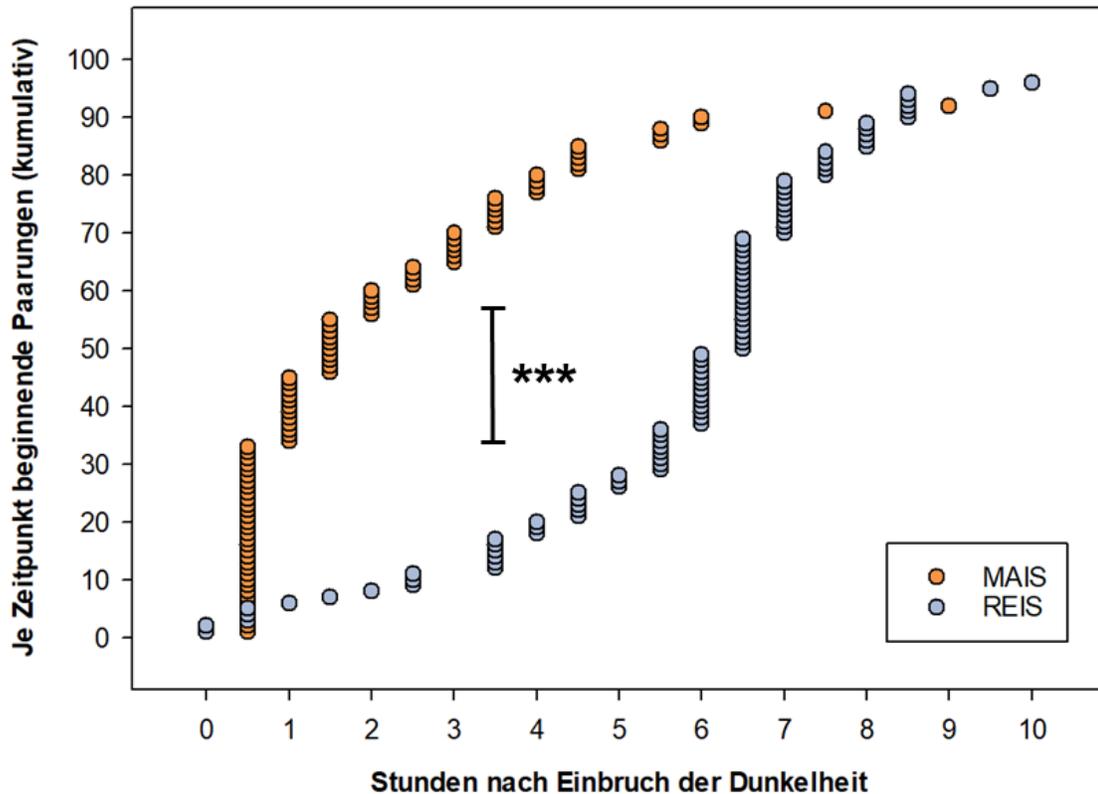


Abbildung 2 Beginn der ersten Kopulationen in beiden *S. frugiperda* Stämmen. Die Stapelhöhen entsprechen der kumulativen Anzahl der Paarungen innerhalb der Dunkelphase, die Scheiben in jedem Stapel der tatsächlichen Anzahl beobachteter Paarungen zum jeweiligen Zeitpunkt. Signifikante Unterschiede zwischen den Stämmen werden durch Sternchen angegeben: *** $P < 0,0001$).

Einige Paare beider Stämme kopulierten nur in einer der beiden Nächte. In der ersten Nacht starteten 23 C-Paare ihre Paarung nach durchschnittlich 2,09 h. Die 30 R-Paare begannen signifikant später nach durchschnittlich 6,12 h. In der zweiten Nacht wurden elf C- und zwei R-Paarungen beobachtet. Diese fanden im Vergleich zur ersten Nacht im Durchschnitt 0,13 h (C) und 2,48 h (R) früher statt (Abb. 3).

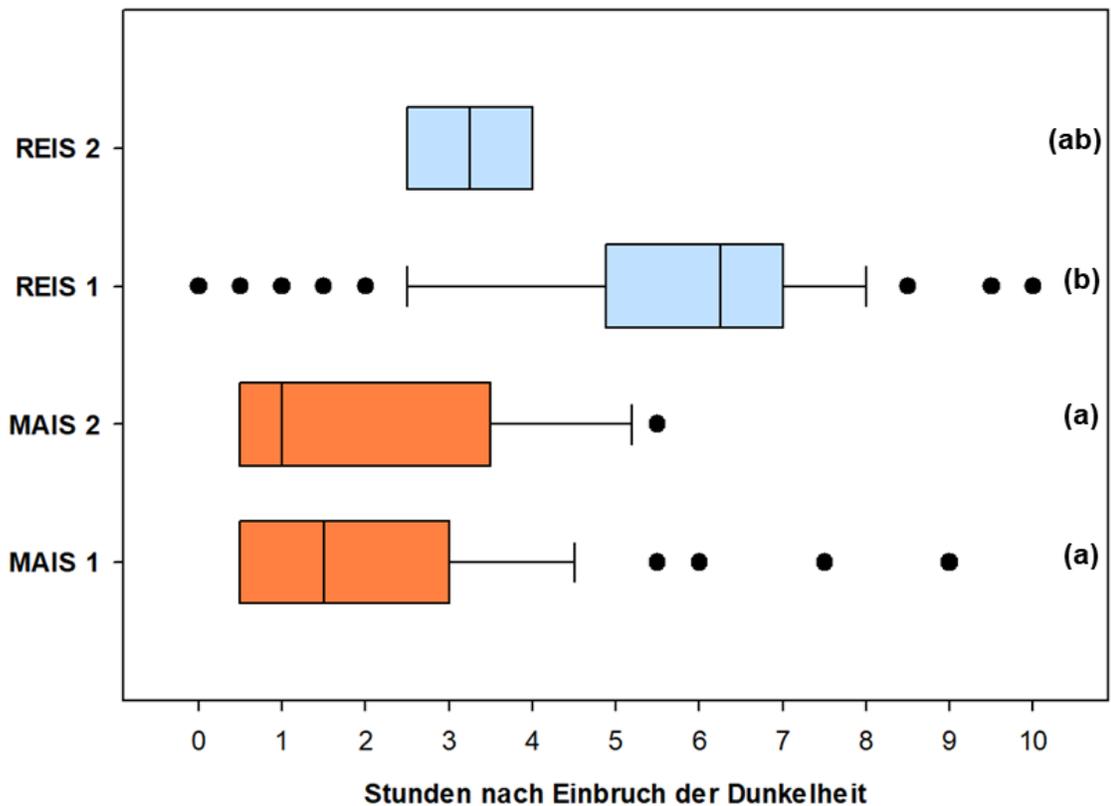


Abbildung 3 Vergleich des Kopulationsbeginns von Paaren beider Stämme des *S. frugiperda*, die sich in der ersten Nacht (Mais 1, Reis 1) oder der zweiten Nacht (Mais 2, Reis 2) zum ersten Mal paarten. Verschiedene Buchstaben indizieren signifikante Unterschiede (Student's T-test, gleicher Buchstabe: $P > 0,05$).

Einige Paare führten Kopulationen in beiden Nächten durch. Die ersten Paarungen begannen nach durchschnittlich 2,04 h (C) respektive 5,73 h (R). Die zweiten Kopulationen der beiden Stämme begannen im Durchschnitt 2,19 h (C) und 1,91 h (R) später als die ersten. Zwischen und innerhalb der Stämme wurden nachtabhängige Unterschiede im Paarungsbeginn ersichtlich.

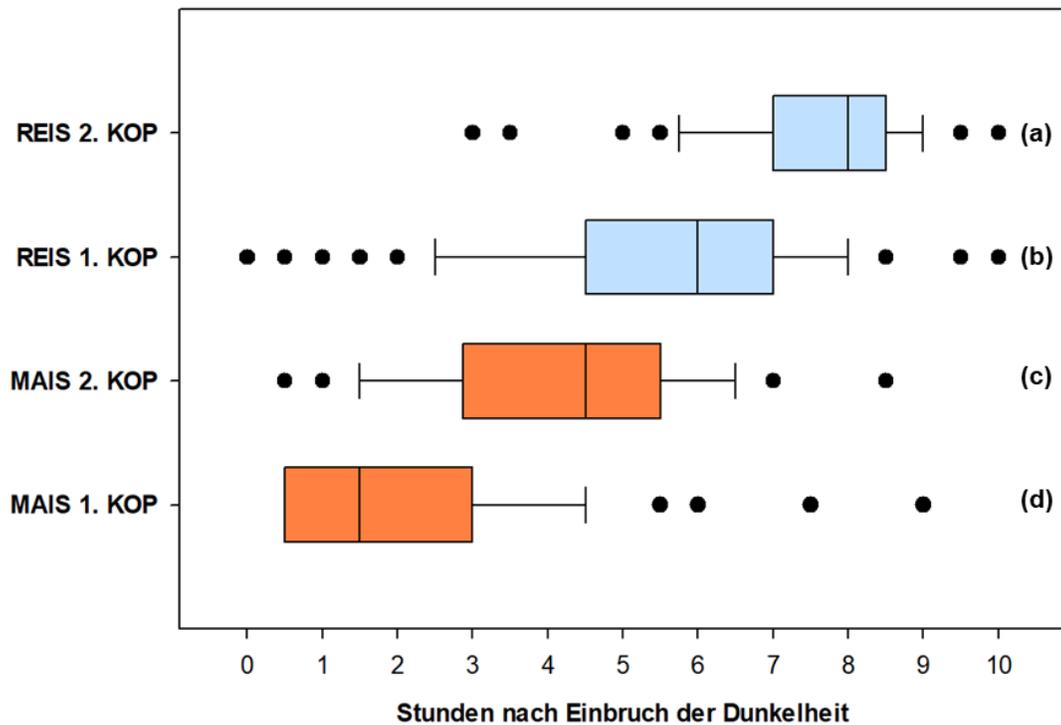


Abbildung 4 Vergleich des Beginns der ersten und zweiten Kopulation im Mais- und im Reisstamm des *S. frugiperda*. Verschiedene Buchstaben indizieren signifikante Unterschiede (Student's T-test, unterschiedlicher Buchstabe: $P < 0,05$).

3.3 Paarungsdauer

Es wurden ausschließlich Paarungen berücksichtigt, die ohne Unterbrechung vorlagen. Die Paarungslängen betragen in der ersten Nacht durchschnittlich 4,39 h (C) und 2,87 h (R). Die Paarungslängen der zweiten Nacht waren im Durchschnitt 3,13 h (C) und 1,64 (h) lang. Somit war die Paarungsdauer in beiden Stämmen in der zweiten Nacht kürzer.

Ähnliche Beobachtungen wurden bei mehrfach kopulierenden Paaren festgestellt (Abb. 5). Die ersten Paarungen waren im Durchschnitt 4,41 h (C) und 2,88 h (R) lang. Die zweiten Paarungen waren durchschnittlich 2,82 h (C) und 1,56 h (R) lang. In beiden Stämmen war die Paarungslänge der zweiten Kopulation kürzer.

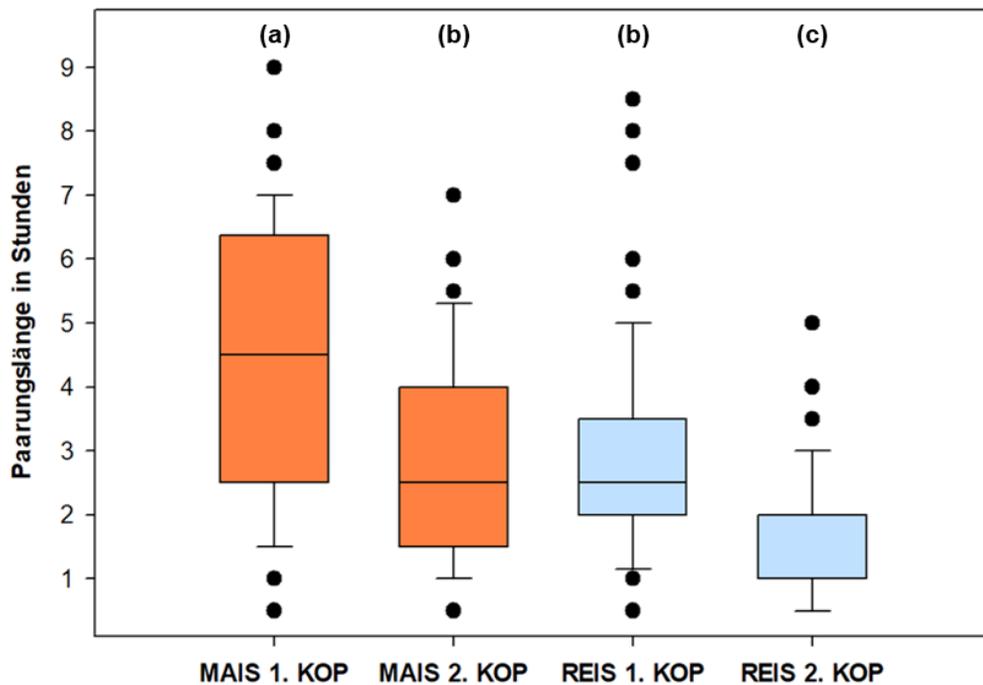


Abbildung 5 Dauer der beobachteten individuellen Paarungen beider *S. frugiperda* Stämme während der ersten (MAIS 1. KOP, REIS 1. KOP) und zweiten Kopulation (MAIS 2. KOP, REIS 2. KOP). Verschiedene Buchstaben indizieren signifikante Unterschiede (Student's T-test, gleicher Buchstabe: $P > 0,05$).

3. 4 Eiablageverhalten

Es wurden 32 Eiablagen im Maisstamm und 39 im Reisstamm beobachtet. Die Eiablage erfolgte im Durchschnitt nach 2,67 h (C) und 3,35 h (R) und zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Stämmen (Abb. 6).

Die Weibchen führten durchschnittlich nach 20,27 h (C) und 18,96 h (R) Eiablagen durch (Abb. 7). Dieser Ruhezeitraum war im Reisstamm im Durchschnitt 1,30 h kürzer und unterschied sich signifikant. Nach den Eiablagen wurden erneute Kopulationen in 22 (C) respektive 29 (R) Paarungen beobachtet. Das entsprach 69 % (C) und 74 % (R) der Gelege platzierenden Weibchen.

Ein Paar des C-Stamms wurde aus den Berechnungen ausgeschlossen, da eine Eiablage ohne beobachtete Kopulation stattfand. Das Weibchen hatte entweder unbefruchtete Gelege platziert oder die Paarung wurde durch einen zu frühen oder zu späten Kopulationszeitpunkt oder wegen zu kurzer Paarungslänge nicht beobachtet.

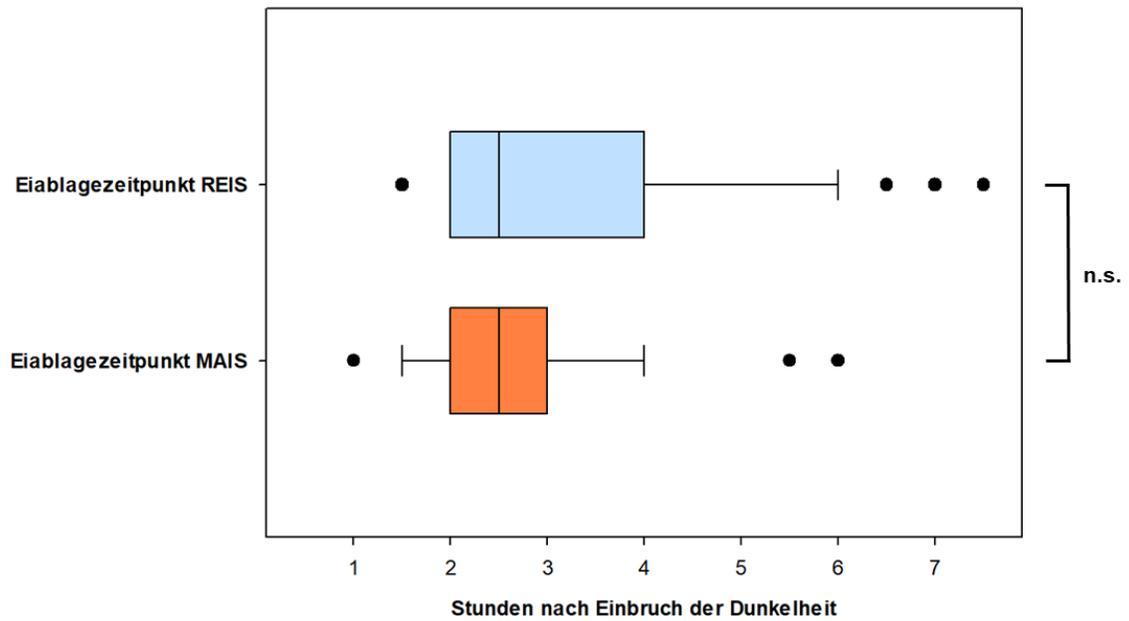


Abbildung 6 Ovipositionszeitpunkte der beiden *S. frugiperda* Stämme in der zweiten Beobachtungsnacht (n.s. = nicht signifikant).

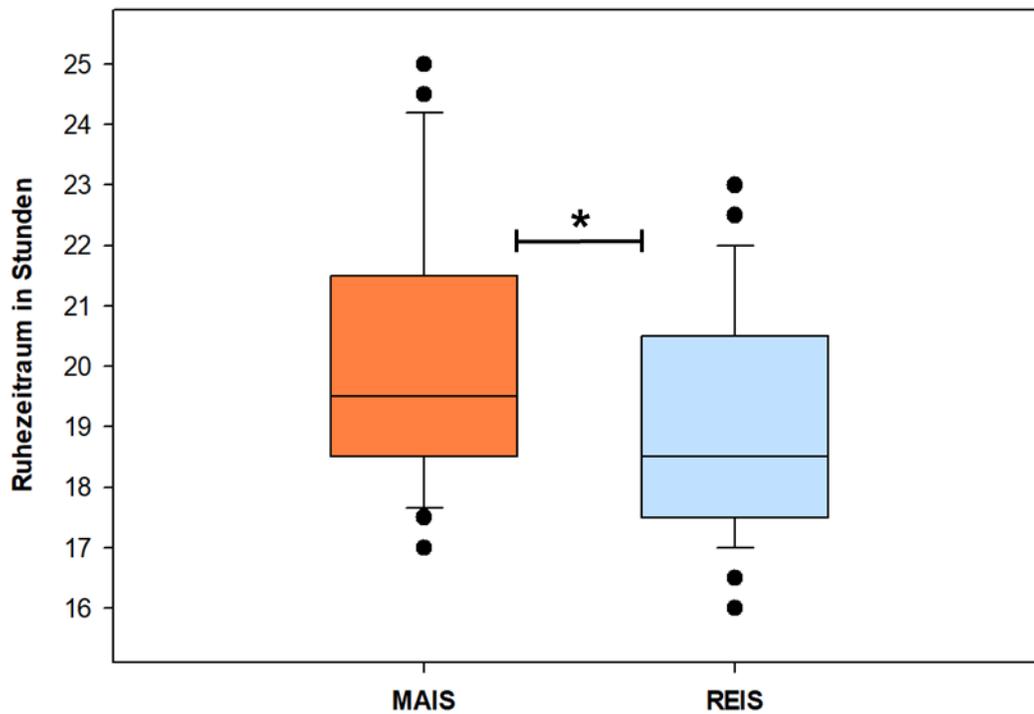


Abbildung 7 Zeitraum vom Ende der ersten Kopulation bis zum Beginn der ersten Eiablage in beiden Stämmen des *S. frugiperda* (Student's T-test, * $P < 0,01$).

3. 5 Stammdiagnose

Zur Kontrolle einer Kontamination zwischen zwei Stämmen von *S. frugiperda* wurde die DNA von 24 Individuen analysiert. Es wurden Marker des nuklearen Triosephosphatisomerase-Gens und des mütterlich vererbten mitochondrialen Cytochromoxidase-I-Gens genutzt, wie von Nagoshi (2006; 2012) beschrieben. Stammuntypische Variationen würden auf eine Vermischung der Laborstämme hindeuten. Die Auswahl der Individuen berücksichtigte beide Stämme und unterschiedliche Paarungszeitpunkte. Durch die Amplifikation des *col*-Fragments wurde die DNA als PCR-fähig eingestuft, da Banden bei allen Individuen sichtbar wurden.

Für alle R-Stamm- und elf C-Stammindividuen wurden Sequenzen generiert, mit Ausnahme von LCf42. Untersucht wurde die *msp1*-Schnittstelle mit der Abfolge CCGG, welche ausschließlich im C-Stamm zu finden ist. Alle Sequenzen zeigten die stammspezifischen Merkmale. Im R-Stamm wurde an dieser Position die Abfolge CTGG gefunden (Tab.5).

Für sämtliche C-Stamm- und elf R-Stammindividuen wurden an der *msp1*-Schnittstelle die stammspezifischen Abfolgen gefunden, mit Ausnahme von LRf174. Außerdem wurden bei elf C-Stamm- und neun R-Stammindividuen stammspezifische Merkmale an der *sac1*-Schnittstelle gefunden. Ausnahmen bildeten LCf42, ERf194, LRf46 und LRf174 die im Reisstamm die Abfolge GAGCTCC aufweisen sollten.

Tabelle 5 Stammdiagnostizierende Sequenzabfolgen der beiden Marker in zwei *Spodoptera frugiperda* Stämmen mit der entsprechend abgedeckten Anzahl an Individuen

Gen	Restriktionsenzym	Stamm	n	Sequenz der Schnittstelle
TPI	MSPI	Reis	12	CTGG
		Mais	11	CCGG
COI	SACI	Reis	9	GAGCTCC
		Mais	11	GGGCTCC
	MSPI	Reis	11	CCAG
		Mais	12	CCGG

3. 6 Sequenzierung der Promotorregion von *vrlle*

Es wurde das Gen *vrlle* untersucht, welches eine Gesamtlänge von 10 500 bp aufweist und in fünf Segmente unterteilt ist (Abb. 8). Nach einer 1 234 bp langen 3'UTR (untranslatierte Region) folgt eine 1 204 bp große proteincodierende Region (CDS). Die 5'UTR besteht aus einem 45 und 375 bp großen Bereich, die das 7 742 bp lange Intron (intra-genic region) umschließen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich das Intron sequenziert, angeglichen und bereinigt. Die Längen der übrigen Gensequenzabschnitte wurden von Hänniger et al. (2017) übernommen, wobei die generierte Intronsequenz die ursprüngliche substituierte.

Innerhalb des Intron wurden elf E-box-Elemente (Enhancer Box A-K) mit der Sequenz CACGTG gefunden (Hänniger et al. 2017). E-boxen werden von Transkriptionsfaktoren erkannt und gebunden, um die Genexpression zu regulieren. Nach der Sequenzierung wurde nach stammspezifischen SNPs (single nucleotide polymorphisms) in E-box-Nähe gesucht. Die

Variation von Einzelpositionen könnte die Expression/Inhibition von Proteinen beeinflussen, die an der circadianen Uhr beteiligt sind. Das Vorhandensein der SNPs lässt nicht zwangsläufig auf die Auswirkung auf die Proteinfunktion schließen.

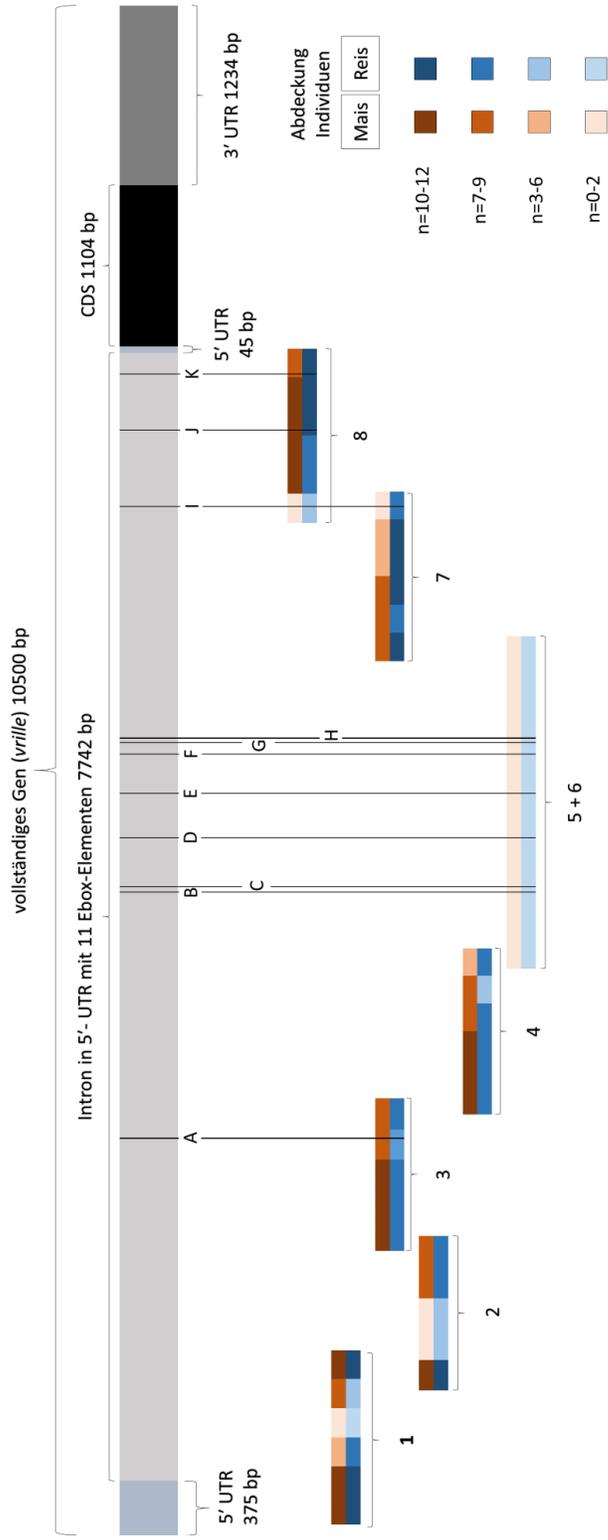


Abbildung 8 Struktur des Gens *vrille*. Gezeigt werden die Positionen der Amplikons (I-8) und der E-box-Elemente (A-K) der beiden *S. frugiperda* Stämme (Maisstamm in Braun-, Reisstamm in Blautönen). Dunklere Farbtöne repräsentieren eine höhere Abdeckung durch individuelle Sequenzen, hellere Töne eine geringere Abdeckung. Die Position (Höhe) der Amplikons ist nach dieser Abdeckung geordnet. Ein Amplikon-Farbsegment entspricht etwa 200 bp.

Es wurden Fragmente des Introns sequenziert. Mithilfe von Referenzsequenzen wurden diese sortiert und verglichen. Die höchste Abdeckung wurde in den Amplikonbereichen 1 und 8 erzielt (Abb. 8). Mangelnde Abdeckungen wurden in den Amplikons 5 und 6 bestimmt, sodass keine Informationen über die E-box-Bereiche um B-H gesammelt wurden. Die Sequenzen aus den Amplikons 3 und 8 zeigten hochkonservierte Bereiche um die E-boxen A und K (Abb. 9). Nahe der E-box I wurde ein stammspezifischer SNP identifiziert. Im Bereich um E-box J waren weder stammspezifische SNPs noch konservierte Abschnitte vorhanden.



Abbildung 8 Vergrößerte Intronsequenzabschnitte mit den dazugehörigen Positionen der E-boxen A, K und I. Im Bereich der E-box I wurde ein stammspezifischer Polymorphismus W6714 des *S. frugiperda* gefunden.

4 Diskussion

4. 1 Schlupfzeitpunkt

Der Schlupfzeitpunkt beider *S. frugiperda* Stämme wurde untersucht, um nach individuellen Differenzen zu suchen. Beide Geschlechter schlüpften gleichermaßen in den ersten beiden Stunden der Dunkelphase. Die ähnlichen Muster wiesen auf eine Kreuzkontamination der Laborstämme hin, welche durch genetische Marker ausgeschlossen wurde. Es wurde gezeigt, dass die individuelle innere Rhythmik an die Bedingungen der Aufzuchtstammern (Lichtverhältnisse, Temperatur) angepasst war und diese maßgeblichen Einfluss auf die Schlupfzeit nimmt. Da die genetische Grundlage dieses Merkmals nicht untersucht wurde, konzentrierte sich die Erklärung des Phänotyps auf die Umweltfaktoren und die Ökologie des nachtaktiven Insekts.

Vergangene Beobachtungen zeigten, dass die Falter sich typischerweise einmal pro Nacht paaren (Wu et al. 2023) und die Weibchen erst in der zweiten Nacht nach dem Schlupf fortpflanzungsfähig sind (Hänniger 2015). Die erste Nacht wird durch energie- und zeitabhängige Prozesse, wie dem Aushärten der inneren Organe, der Wirtspflanzensuche und dem Bilden von Sexualpheromonen, bestimmt. Je später die Falter schlüpfen, desto weniger Zeit steht ihnen in der ersten Nacht zu Verfügung. Mit Tagesanbruch steigt das Risiko von Prädatoren entdeckt zu werden. Durch die einmalige Paarung pro Nacht stehen die Männchen unter Konkurrenzdruck. Ein früher Schlupf erhöht die Wahrscheinlichkeit auf Paarung. Somit kann der Schlupfzeitpunkt mit dem Paarungsverhalten zusammenhängen.

Trotz ähnlicher Schlupfmuster, wurden der Unterschiede im Paarungsbeginn innerhalb und zwischen den Stämmen beobachtet. Die höhere Variabilität könnte auf eine Vielzahl von interagierenden Faktoren zurückzuführen sein. Der Paarungsbeginn hängt von zwei Individuen ab und wird durch die Pheromonzusammensetzung und -attraktivität, Struktur der Genitalien, Fitness, Falterentwicklung und von Umweltfaktoren beeinflusst. Der Schlupfzeitpunkt zeigte geringere Schwankung als die Paarungszeit, da dieser weniger von situativen und individuellen Faktoren abhängt.

Aufgrund der Beständigkeit und der Abhängigkeit an Umweltfaktoren wurde der Phänotyp des Schlupfzeitpunktes als ungeeignet bewertet, um individuelle zeitliche Unterschiede zu bestimmen. Wenn die circadiane Uhr beider Stämme differieren würde, dann müssten sich beide Verhaltensweisen entsprechend unterscheiden. Dies deutet darauf hin, dass die Unterschiede im Paarungsbeginn vermutlich nicht auf Unterschieden in den Genen der circadianen Uhr basieren. Da *vrille* zusätzlich zu seiner Funktion innerhalb der circadianen Uhr, die Funktion eines locomotor-output Genes hat (Hardin 2011; Gunawardhana and Hardin 2017), könnte es dennoch die Unterschiede im Paarungsverhalten erklären.

4. 2 Paarungsbeginn

Die Untersuchung des Paarungsverhaltens von *S. frugiperda* Paarungen zeigte Unterschiede zwischen den Stämmen und ermöglichte den Vergleich mit früheren Beobachtungen. Der C-Stamm begann die Paarung mit dem Einsetzen der Dunkelphase und lag im Durchschnitt

etwa 3,5 h vor dem R-Stamm. Trotz einer Laboraufzucht von über 30 Generationen zeigten beide Stämme ihr stammspezifisches Verhalten. Dies zeigte, dass der Paarungsbeginn genetisch festgelegt ist (Cruz-Esteban et al. 2017).

Ähnliche Muster wurden in früheren Untersuchungen in Stämmen aus Florida und Louisiana beobachtet, wodurch der Paarungsbeginn als ein beständiges Unterscheidungsmerkmal zwischen den Stämmen gilt (Pashley et al. 1992; Schöfl et al. 2009).

Pashley et al. (1992) beobachteten den Paarungsbeginn des C-Stamms in den ersten sechs Stunden der Dunkelphase, während Schöfl et al. (2009) eine höhere Varianz feststellten. Der R-Stamm neigte zu einem späten Paarungsbeginn, obwohl Überlappungen zwischen den stammspezifischen Paarungszeiten festgestellt wurden. Außerhalb dieser Überlappungen wäre die Wahrscheinlichkeit auf den Erhalt der Reinstämme im Feld am höchsten. Gleichzeitige sexuelle Aktivität beider Stämme erhöht die Wahrscheinlichkeit von Paarungen zwischen den Stämmen und könnte zur potentiellen Entstehung von Hybriden führen.

In der zweiten Nacht kopulierten weniger Paare als in der ersten. Dies könnte auf eine erfolgreiche Befruchtung in der ersten Nacht zurückzuführen sein, wodurch der Antrieb zu mehrfacher Paarung sinkt. In anderen Insektenarten reicht eine Paarung aus, damit die Weibchen ihren maximalen reproduktiven Output erreichen, obwohl diese dazu tendieren sich mehrfach zu paaren (Simmons 2002). Ab der zweiten Nacht könnten aus Gründen der genetischen Vielfalt neue Partner bevorzugt werden. Ein Versuchsaufbau könnte dies prüfen, indem Paarungen des Vortages in zwei Gruppen aufgeteilt werden. In der Kontrollgruppe wären Falter mit ihrem ursprünglichen Partner zusammengesetzt, in der Versuchsgruppe erhalten diese neue Partner. Unter der Annahme müsste die Versuchsgruppe eine höhere Anzahl an Paarungen zeigen.

In der zweiten Nacht verzögerten Eiablagen beider Stämme die Paarungen. Gelegetplatzierende Weibchen des C-Stamms könnten in der zweiten Nacht Tendenzen zeigen, sich mit den R-Männchen zu paaren. Die Männchen des C-Stamms könnten im Feld einen späteren Paarungszeitpunkt aufzeigen, da zu Beginn der Nacht weniger Partnerinnen verfügbar sind. Dies könnte zu einer höheren Hybridisierungsrate in folgenden Nächten führen. Zur Überprüfung könnten getrennte Käfige für C- und R-Reinstammpaarungen präpariert werden. In der zweiten Nacht werden Paare mit Eier legenden Weibchen voneinander getrennt und in zwei Gruppen mit entweder C- oder R-Stamm Männchen zusammengebracht. Durch die Paarungsanzahl kann bestimmt werden, ob die Wahrscheinlichkeit auf Hybridisierung erhöht wird.

Wu et al. (2023) beobachteten einen hohen Kopulationsdrang jungfräulicher Falter durch intensives Werbe- und Lockverhalten. Paare, die sich in der ersten Nacht nicht paarten, könnten in der zweiten früher starten. Bereits gepaarte würden in der zweiten Nacht später anfangen. Frühere Beobachtungen zeigten, dass zuerst Jungfern-Weibchen, dann einmal verpaarte und im Anschluss die mehrfach verpaarten riefen und Paarungen aufnahmen (Sparks 1979).

In beiden Stämmen wurden jeweils ein Paar mit permanenter Paarung beobachtet. Dies könnte die Folge von variierenden Strukturunterschieden der Genitalien sein (Wanke 2022). Diese Paare wurden in den Beobachtungsdatensätzen nicht berücksichtigt, um Ausreißer im

Paarungsbeginn und der Paarungslänge zu vermeiden und Oviposition durch permanente Begattung ausblieb.

4. 3 Paarungsdauer

Innerhalb und zwischen den Stämmen wurden unterschiedliche Paarungslängen beobachtet. Im R-Stamm wurde eine kürzere Dauer festgestellt, da weniger Dunkelphasenzeit zur Verfügung stand. Dies führte zur Frage, ob eine kürzere Dauer den Reproduktionserfolg beeinflusst. Eine kürzere Paarungsdauer könnte zu einer geringeren Spermienübertragung führen, welche die Befruchtungschance der Eier einschränkt. Trotz kürzerer Paarungsdauer produzierten mehr R-Stammpaare Gelege. Die höhere Anzahl von Gelege platzierenden Paaren erlaubt keine Aussage über die Fertilität der Eier. Die Menge der übertragenen Spermien scheint nicht der einzige Faktor für den Reproduktionserfolg zu sein.

In erneuten Paarungen wurden in beiden Stämmen kürzere Paarungslängen zu späteren Zeitpunkten beobachtet. Es ist denkbar, dass Prozesse wie Pheromon- und Spermienproduktion Zeit benötigen und nicht in der gleichen Menge wie in der ersten Paarung zur Verfügung stehen. Beobachtungen von Wu et al. (2023) zeigten, dass nach der ersten Paarung Veränderungen in Genen auftraten, die mit der Reproduktion und der Körpererhaltung assoziiert sind. Unter dieser Annahme könnten die Paarungen der zweiten Nacht einen geringeren reproduktiven Erfolg erzielen. Wenn durch verkürztes Paaren weniger Nachwuchs produziert wird, könnte dies Auswirkungen auf das Gleichgewicht der beiden Stämme haben.

Um den Zusammenhang zwischen Paarungsdauer und reproduktiven Erfolg zu untersuchen, könnten Paarungen beider Stämme beobachtet werden. Die Weibchen werden aufgrund der Paarungsdauer separiert. Der reproduktive Erfolg ergibt sich aus der Anzahl und Größe der Gelege. Alternativ kann die Anzahl der heranwachsenden Raupen bestimmt werden.

4. 4 Eiablageverhalten

Die Eiablage erfolgte in beiden Stämmen größtenteils innerhalb der ersten fünf Stunden in Dunkelheit. Ähnliche Ergebnisse wurden in den Untersuchungen von Schöfl et al. (2009) und Pashley et al. (1992) beobachtet. Alle Arbeiten zeigten im C-Stamm eine Präferenz für frühe Ablagen, während im R-Stamm eine höhere Varianz beobachtet wurde. Trotz Unterschieden im Paarungsbeginn und in der Paarungslänge, wiesen die Stämme nach eigenen Beobachtungen ähnliche Ablageverhalten auf.

Vermutlich stellt das Ei die empfindlichste Lebensphase des Falters dar (Srivastava et al. 2021). Die Umweltbedingungen könnten eine frühe Ablage begünstigen, um den aktiven Zeiten von Pflanzenabwehrsystemen und Fressfeinden zu entgehen. Der Paarungsbeginn wird wahrscheinlich stärker durch die Feinde der Adulten bestimmt. *S. frugiperda* ist eine migrierende Motte und trifft in verschiedenen Habitaten auf unterschiedliche Pflanzen und Fressfeinde (Rose et al. 1975). Daher scheint diese Theorie unwahrscheinlich.

Unabhängig vom Habitat ist die Bildung vom Morgentau. Mit dem Einsetzen der Lichtphase sammelt sich dieser an den Wirtspflanzen. Dieser könnte die Oberflächenbeschaffenheit beeinflussen, sodass die Haftfähigkeit der Eier beeinträchtigt wird. So könnten frühe Ablagen

diesen Effekten ausweichen. Allerdings zeigten Beobachtungen das Morgentau die Austrocknung von Gelegen verhindern kann.

Die hohe Kopulationsrate nach Eiablage weist darauf hin, dass Weibchen mehrere befruchtete Eiablagen durchführen können. Dadurch könnten frühe Ablagen vorteilhaft sein. Den Weibchen würde mehr nächtliche Zeit zur Verfügung stehen, um regenerative Prozesse zu durchlaufen, Nahrung aufzunehmen und um möglicherweise erneute Kopulation aufzunehmen.

4. 5 Stammdiagnose

Durch die molekularen Marker des *col*- und *tpi*-Gens erfolgte die Identifizierung von Herbst-Heerwurmreinstämmen. Durch die Kombination der verwendeten Marker wurde die Stammzugehörigkeit jedes Individuums bestimmt, welche der erwarteten Stammherkunft entsprach. Die Auswahl der Individuen erfolgte taktisch, um sowohl frühe als auch späte Paarung von beiden Stämmen einzubeziehen. Obwohl der Phänotyp des Schlupfzeitpunktes Durchmischungen zwischen den Stämmen vermuten ließ, konnten Kontaminationen auf genetischer Ebene ausgeschlossen werden.

4. 6 Sequenzierung der Promotorregion von *vrlle*

Die Analyse des Introns innerhalb der 5'UTR des Gens *vrlle* in beiden Stämmen zeigte Bereiche mit schwankenden Sequenzierungsergebnissen. Introns sind nicht-kodierende Abschnitte der DNA, die in Individuen der gleichen Art variieren können (Ni et al. 2023).

Die durchschnittliche Abdeckung der Amplikons wurde verglichen. Zentrale Bereiche des Introns (Amplikon 4-6) wurden schwächer abgedeckt, als außenliegende (Amplikon 1 und 8) (Abb. 8). Das am nächsten zur kodierenden Sequenz positionierte Amplikon, wies die höchste Abdeckung auf. Obwohl Introns nicht kodieren, können sie regulatorische Elemente beinhalten, welche die Genexpression beeinflussen (Girardini et al. 2023). Im vorliegenden Intron sind dies E-box-Elemente, an die bei Genen der circadianen Uhr Heterodimere aus *clock*- und *cycle*-Proteinen binden und die Transkription ermöglichen. Die hohe Konservierung von Bereichen um die E-boxen A und K deuten darauf hin, dass diese eine funktionelle Rolle haben können. Die niedrigere Abdeckung im zentralen Bereich, könnte auf eine geringe funktionelle Bedeutung der darin liegenden E-boxen hindeuten, wodurch höhere Variabilität vorlag. Die höhere Variabilität könnte dafür verantwortlich sein, dass die Primer nicht angebonden hatten. Primer-Templat Assoziationen sind entscheidend für die Amplifizierung von DNA (Stadhouders et al. 2010).

Auffällige Bereiche wurden in den Amplikons 1-3 gefunden. Obwohl Amplikon 1 eine hohe durchschnittliche Sequenzabdeckung aufwies, wurde diese durch die Abdeckung der beiden Amplikonsegmente außerhalb des 5' UTR Introns beeinträchtigt. Sobald der Intronbereich begann, lagen Sequenzverrauschungen vor. In den Amplikons 1 und 2 wurde in über 20 Individuen niedrige Qualitäten von Sequenzspuren festgestellt, die vor allem in A- und T-reichen Bereichen auftraten. Lange mononukleare Bereiche können bewirken, dass die DNA-Polymerase von dem Template abrutscht (Fazekas et al. 2010). Dabei werden eine oder mehrere Basen übersprungen und Produkte differentieller Basenlänge erzeugt. Wenn die Einzelstränge wieder gebunden werden, können Schleifen und andere Strukturen entstehen,

die das Signal der Sequenz beeinträchtigen. Obwohl diese mononuklearen Abfolgen auch im Amplikon 3 gefunden wurden, wurde dieser Bereich erfolgreich sequenziert. Die Sequenzierung zeigte, dass der Bereich um E-box A für eine Länge von 263 bp hoch konserviert war (Abb. 9). Beim Vergleich mit den in-house Gensequenzen wurde ersichtlich, dass diese Sequenzen in den Amplikon 1 und 2 stärker von diesen abwichen, als die von Amplikon 3. Dies bestätigte die Annahme, dass konservierte Bereiche bessere Sequenzierungen ermöglichen. Um Sequenzierungsergebnisse in diesem Bereich zu verbessern, könnte die Auswahl und Position der Primer angepasst werden, sodass diese außerhalb der T- und A-reichen Bereiche anlagern. Außerdem könnten Verkleinerungen der Amplikons in Betracht gezogen werden, um den Informationsverlust bei Abrutschungen der DNA-Polmerase zu verringern. Dies würde die Kosten und den Aufwand der Methode durch eine Anzahlerhöhung der nötigen Primerkombinationen für das gesamte Intron erhöhen. Ziel dieser Anpassungen wäre die Optimierung der Prozessivität der Polymerase und die Verbesserung der Sequenzierungsqualität.

Untersuchungen von Hänniger et al. (2017) zeigten SNPs in den E-boxen E, F und I. Diese wurden anhand des IUPAC-Codes für unvollständige Nukleotide benannt und entsprechend der auftretenden Variation und Position bezeichnet. Die SNPs W4717, D4724, IN/DEL4816 und M4870 konnten in dieser Studie nicht identifiziert werden, da Sequenzen um die E-boxen E und F nicht abgedeckt wurden. Der SNP W6690 wurde durch das Angleichen an die hausinternen Sequenzen im Bereich um die E-box I an der Position 6714 beobachtet (siehe Abb. 9). Das „W“ codiert für das mögliche Auftreten der Basen Thymin und Adenin, die von Hänniger et al. (2019) stammspezifisch beobachtet wurden. Bei allen sieben Reisstamm-Individuen wurde ausschließlich Adenin identifiziert. Aufgrund fehlender Maisstammsequenzen wurde das Vorhandensein von Thymin an dieser Stelle nicht verifiziert.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die genetischen und Verhaltensdifferenzen der beiden *S. frugiperda* Stämme untersucht. Die genetisch als reine Stämme identifizierten Populationen unterschieden sich in ihrer Paarungszeit. Die unterschiedlichen Paarungszeiten tragen dazu bei, die Stämme voneinander zu trennen. Es wurden Informationen in der Promotorregion des Gens *vrille* gesammelt, wobei der Einfluss von *vrille* auf die Artentwicklung unklar bleibt. Abschließend wurden Ideen zur Sequenzoptimierung und für künftige Beobachtungsexperimente vorgeschlagen.

Quellen

- Banson, K. E., D. K. Asare, F. D. Dery, K. Boakye, A. Boniface, M. Asamoah, and L. E. Awotwe. 2020. Impact of Fall Armyworm on Farmer's Maize: Systemic Approach. *Systemic Practice and Action Research* 33:237-264.
- Barat, M., M. Tarayre, and A. Atlan. 2007. Plant phenology and seed predation: interactions between gorses and weevils in Brittany (France). *Entomol. Exp. Appl.* 124:167-176.
- Brehm, G., J. Niermann, L. M. J. Nino, D. Enseling, T. Justel, J. C. Axmacher, E. Warrant, and K. Fiedler. 2021. Moths are strongly attracted to ultraviolet and blue radiation. *Insect Conservation and Diversity* 14:188-198.
- Bush, G. L. 1969. Sympatric host race formation and speciation in frugivorous flies of the genus *Rhagoletis* (Diptera, Tephritidae). *Evolution* 23:237-&.
- Butlin, R. K. and C. M. Smadja. 2018. Coupling, Reinforcement, and Speciation. *Am. Nat.* 191:155-172.
- Coates, B. S., G. M. Kozak, K. S. Kim, J. Sun, Y. Z. Wang, S. J. Fleischer, E. B. Dopman, and T. W. Sappington. 2019. Influence of host plant, geography and pheromone strain on genomic differentiation in sympatric populations of *Ostrinia nubilalis*. *Mol. Ecol.* 28:4439-4452.
- Cruz-Esteban, S., J. C. Rojas, and E. A. Malo. 2017. Calling Behavior, Copulation Time, and Reproductive Compatibility of Corn-Strain Fall Armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) From Populations in Mexico. *Environ. Entomol.* 46:901-906.
- Doorn, S. G. v., J. Schepers, R. R. Hut, and A. T. Groot. in prep. Resolution of sexual conflict by sex-specific expression of circadian rhythms enables allochronic diversification in the noctuid moth *Spodoptera frugiperda*
- Dumas, P., F. Legeai, C. Lemaitre, E. Scaon, M. Orsucci, K. Labadie, S. Gimenez, A. L. Clamens, H. Henri, F. Vavre, J. M. Aury, P. Fournier, G. J. Kergoat, and E. d'Alencon. 2015. *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) host-plant variants: two host strains or two distinct species? *Genetica*.
- Eschen, R., T. Beale, J. M. Bonnin, K. L. Constantine, S. Duah, E. A. Finch, F. Makale, W. Nunda, A. Ogunmodede, C. F. Pratt, E. Thompson, F. Williams, A. Witt, and B. Taylor. 2021. Towards estimating the economic cost of invasive alien species to African crop and livestock production. *Cabi Agriculture & Bioscience* 2.
- Fazekas, A. J., R. Steeves, and S. G. Newmaster. 2010. Improving sequencing quality from PCR products containing long mononucleotide repeats. *BioTechniques* 48:277-281.
- Feder, J. L., C. A. Chilcote, and G. L. Bush. 1988. Genetic differentiation between sympatric host races of the apple maggot fly *Rhagoletis pomonella*. *Nature* 336:61-64.
- Girardini, K. N., A. M. Olthof, and R. N. Kanadia. 2023. Introns: the "dark matter" of the eukaryotic genome. *Frontiers in Genetics* 14.

- Goergen, G., P. L. Kumar, S. B. Sankung, A. Togola, and M. Tamo. 2016. First Report of Outbreaks of the Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* (J E Smith) (Lepidoptera, Noctuidae), a New Alien Invasive Pest in West and Central Africa. Plos One 11.
- Gunawardhana, K. L. and P. E. Hardin. 2017. VRILLE Controls PDF Neuropeptide Accumulation and Arborization Rhythms in Small Ventrolateral Neurons to Drive Rhythmic Behavior in *Drosophila*. Curr. Biol. 27:3442-+.
- Hänniger, S. 2015. Chasing sympatric speciation: The relative importance and genetic basis of prezygotic isolation barriers in diverging populations of *Spodoptera frugiperda*.
- Hänniger, S., P. Dumas, G. Schöfl, S. Gebauer-Jung, H. Vogel, M. Unbehend, D. G. Heckel, and A. T. Groot. 2017. Genetic basis of allochronic differentiation in the fall armyworm. BMC Evol. Biol. 17.
- Hänniger, S., G. Goergen, M. D. Akinbuluma, M. Kunert, D. G. Heckel, and M. Unbehend. 2020. Sexual communication of *Spodoptera frugiperda* from West Africa: Adaptation of an invasive species and implications for pest management. Sci Rep 10.
- Hardin, P. E. 2005. The circadian timekeeping system of *Drosophila*. Curr. Biol. 15:R714-R722.
- Hardin, P. E. 2011. Molecular genetic analysis of circadian timekeeping in *Drosophila*. Adv. Genet. 74:141-173.
- Juárez, M. L., G. Schöfl, M. Vera, J. Vilardi, M. Murua, E. Willink, S. Hänniger, D. G. Heckel, and A. T. Groot. 2014. Population structure of *Spodoptera frugiperda* maize and rice host forms in South America: are they host strains? Entomol. Exp. Appl.
- Kenis, M., G. Benelli, A. Biondi, P. A. Calatayud, R. Day, N. Desneux, R. D. Harrison, D. Kriticos, I. Rwomushana, J. van den Berg, F. Verheggen, Y. J. Zhang, L. K. Agboyi, R. B. Ahissou, M. N. Ba, J. Bernal, A. D. Bueno, Y. Carriere, G. A. Carvalho, X. X. Chen, L. Cicero, H. du Plessis, R. Early, P. Fallet, K. K. M. Fiaboe, D. M. Firake, G. Goergen, A. T. Groot, R. N. C. Guedes, A. Gupta, G. Hu, F. Huang, L. R. Jaber, E. A. Malo, C. B. McCarthy, R. L. Meagher, S. Mohamed, D. M. Sanchez, R. N. Nagoshi, N. Negre, S. Niassy, N. Ota, C. Nyamukondiwa, C. Omoto, S. R. Palli, R. Pavela, R. Ramirez-Romero, J. C. Rojas, S. Subramanian, B. E. Tabashnik, W. T. Tay, E. G. Virla, S. Wang, T. Williams, L. S. Zang, L. S. Zhang, and K. M. Wu. 2023. Invasiveness, biology, ecology, and management of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. Entomol. Gen. 43:187-241.
- Kochansky, J., R. T. Cardé, J. Liebherr, and W. L. Roelofs. 1975. Sex pheromone of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* Lepidoptera: Pyralidae in New York USA. J. Chem. Ecol. 1:225-231.
- Lanzaro, G. C., Y. T. Toure, J. Carnahan, L. B. Zheng, G. Dolo, S. Traore, V. Petrarca, K. D. Vernick, and C. E. Taylor. 1998. Complexities in the genetic structure of *Anopheles gambiae* populations in west Africa as revealed by microsatellite DNA analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95:14260-14265.

- Lassance, J.-M., A. T. Groot, M. A. Lienard, B. Antony, C. Borgwardt, F. Andersson, E. Hedenstrom, D. G. Heckel, and C. Löfstedt. 2010. Allelic variation in a fatty-acyl reductase gene causes divergence in moth sex pheromones. *Nature* 466:486-U487.
- Meagher, R. L. and M. Gallo-Meagher. 2003. Identifying host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Florida using mitochondrial markers. *Fla. Entomol.* 86:450-455.
- Meagher, R. L., R. N. Nagoshi, and C. J. Stuhl. 2011. Oviposition choice of two fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains. *J. Insect Behav.* 24:337-347.
- Nagoshi, R. N. 2010. The fall armyworm triose phosphate isomerase (*Tpi*) gene as a marker of strain identity and interstrain mating. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 103:283-292.
- Nagoshi, R. N. 2012. Improvements in the identification of strains facilitate population studies of fall armyworm subgroups. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 105:351-358.
- Nagoshi, R. N., R. L. Meagher, J. J. Adamczyk, S. K. Braman, R. L. Brandenburg, and G. Nuessly. 2006. New restriction fragment length polymorphisms in the cytochrome oxidase I gene facilitate host strain identification of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) populations in the southeastern United States. *J. Econ. Entomol.* 99:671-677.
- Ni, R. Y., Y. W. Wang, Q. Z. Zhong, M. Li, D. D. Zhang, Y. J. Zhang, and X. H. Qiu. 2023. Absence of known knockdown resistance mutations but fixation of CYP337B3 was detected in field populations of *Helicoverpa armigera* across China. *Pestic. Biochem. Physiol.* 195.
- Pashley, D. P. 1986. Host-associated genetic differentiation in fall armyworm (Lepidoptera, Noctuidae) - a sibling species complex. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 79:898-904.
- Pashley, D. P., A. M. Hammond, and T. N. Hardy. 1992. Reproductive isolating mechanisms in fall armyworm host strains (Lepidoptera, Noctuidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 85:400-405.
- Prowell, D. P., M. McMichael, and J. F. Silvain. 2004. Multilocus genetic analysis of host use, introgression, and speciation in host strains of fall armyworm (Lepidoptera : Noctuidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 97:1034-1044.
- Rose, A. H., R. H. Silversides, and O. H. Lindquist. 1975. Migration by an aphid, *Rhopalosiphum maidis* (Hemiptera, Aphididae), and a Noctuid, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidea). *Can. Entomol.* 107:567-576.
- Rund, S. S., S. J. Lee, B. R. Bush, and G. E. Duffield. 2012. Strain- and sex-specific differences in daily flight activity and the circadian clock of *Anopheles gambiae* mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 58:1609-1619.
- Rundle, H. D. and P. Nosil. 2005. Ecological speciation. *Ecol. Lett.* 8:336-352.
- Schöfl, G., D. G. Heckel, and A. T. Groot. 2009. Time-shifted reproductive behaviours among fall armyworm (Noctuidae: *Spodoptera frugiperda*) host strains: evidence for differing modes of inheritance. *J. Evol. Biol.* 22:1447-1459.
- Simmons, L. W. 2002. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects (vol 77, pg 209, 2002). *Q. Rev. Biol.* 77:346-346.

- Smadja, C. and R. K. Butlin. 2009. On the scent of speciation: the chemosensory system and its role in premating isolation. *Heredity* 102:77-97.
- Sota, T., S. Yamamoto, J. R. Cooley, K. B. R. Hill, C. Simon, and J. Yoshimura. 2013. Independent divergence of 13- and 17-y life cycles among three periodical cicada lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110:6919-6924.
- Sparks, A. N. 1979. Review of the biology of the fall armyworm (Lepidoptera, Noctuidae). *Fla. Entomol.* 62:82-87.
- Srivastava, S., G. Mishra, and H. N. Mishra. 2021. Vulnerability of different life stages of *Sitophilus oryzae* insects in stored rice grain to ozone treatment and its effect on physico-chemical properties in rice grain. *Food Frontiers* 2:494-507.
- Stadhouders, R., S. D. Pas, J. Anber, J. Voermans, T. H. M. Mes, and M. Schutten. 2010. The Effect of Primer-Template Mismatches on the Detection and Quantification of Nucleic Acids Using the 5' Nuclease Assay. *Journal of Molecular Diagnostics* 12:109-117.
- Tauber, E., H. Roe, R. Costa, J. M. Hennessy, and C. P. Kyriacou. 2003. Temporal mating isolation driven by a behavioral gene in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 13:140-145.
- Unbehend, M., S. Hänniger, R. L. Meagher, D. G. Heckel, and A. T. Groot. 2013. Pheromonal divergence between two strains of *Spodoptera frugiperda*. *J. Chem. Ecol.* 39:364-376.
- Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm, and S. G. Rozen. 2012. Primer3 - new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40.
- Walsh, B. D. 1864. On phytophagic varieties and phytophagic species. *Proceedings Entomological Society of Philadelphia* iii:pp. 403-430.
- Walsh, B. D. 1867. The apple-worm and the apple maggot. *Journal of Horticulture* 2:338-343.
- Wanke, D. 2022. Interaction of the external and internal genitalia during copulation in *Eupithecia abbreviata* Stephens, 1831 (Lepidoptera: Geometridae: Larentiinae). *Integrative Systematics: Stuttgart Contributions to Natural History* 5:137-143.
- Wu, Q. L., L. M. He, X. J. Shen, Y. Y. Jiang, J. Liu, G. Hu, and K. M. Wu. 2019. Estimation of the Potential Infestation Area of Newly-invaded Fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* in the Yangtze River Valley of China. *Insects* 10.
- Wu, T., D. H. Cao, Y. Liu, H. Yu, D. Y. Fu, H. Ye, and J. Xu. 2023. Mating-Induced Common and Sex-Specific Behavioral, Transcriptional Changes in the Moth Fall Armyworm (*Spodoptera frugiperda*, Noctuidae, Lepidoptera) in Laboratory. *Insects* 14.

Selbstständigkeitserklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unerlaubte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle Stellen, die inhaltlich oder wörtlich aus Veröffentlichungen stammen, sind kenntlich gemacht. Diese Arbeit lag in der gleichen oder ähnlichen Weise noch keiner Prüfungsbehörde vor und wurde bisher noch nicht veröffentlicht. Hiermit erkläre ich mich mit der Einsichtnahme in meine Abschlussarbeit im Archiv der Bibliothek der EAH Jena einverstanden / nicht einverstanden.

.....

André Michael Richter

22.09.2023