

Anwendung der Stabil-Isotopenanalytik zur Identifizierung der Herkunft von invasiven Schadinsekten, die in neuen Gebieten aufgefunden werden (ISOTOPEST) (Euphresco Projekt 2017-A-250)

Endbericht zum Forschungsprojekt 101366



**Anwendung der Stabil-Isotopenanalytik zur
Identifizierung der Herkunft von invasiven
Schadinsekten, die in neuen Gebieten
aufgefunden werden (ISOTOPEST)
(Euphresco Projekt 2017-A-250)**

Endbericht zum Forschungsprojekt 101366

Wien, 2022

Impressum

Projektnehmer/in: Bundesforschungs- und Ausbildungszentrum für Wald, Naturgefahren und Landschaft

Institut für Waldschutz

Adresse: Seckendorff-Gudent-Weg 8, 1131 Wien

Projektleiter/in: Priv.-Doz. DI Dr. Gernot Hoch

Tel. : 01/87838-1155

E-Mail: gernot.hoch@bfw.gv.at

Kooperationspartner/innen:

Dr. Micha Horacek: Department für Lithosphärenforschung, Universität Wien

Priv.-Doz. Dr. Rebecca Hood-Nowotny: Universität für Bodenkultur Wien, Department für Wald- und Bodenwissenschaften, Konrad Lorenz-Straße 24, 3430 Tulln an der Donau

Finanzierungsstellen: BMLRT (für österreichischen Projektteil)

Projektlaufzeit: 1.12.2018 bis 31.7.2022

1. Auflage

Alle Rechte vorbehalten.



Wien, 2022. Stand: 28. Juli 2022

Inhalt

Vorwort	5
Zwischenbericht zum Forschungsprojekt 101366	6
1. Das EUPHRESKO Projekt 2017-A-250	6
2. Ergebnisse der Arbeiten in den einzelnen Work Packages	8
2.1 Projektmanagement und Koordination (WP 1)	8
2.2 Sammlung von Probenmaterial (WP 2).....	9
2.3 Analyse stabiler Isotope (WP 3)	12
2.4 Verbreitung der Ergebnisse (WP 4).....	23
3. Kurzfassung.....	25
4. Abstract	26

Vorwort

Dies ist der Endbericht des österreichischen Projektpartners im Euphresco Projekt 2017-A-250 "Use of Stable Isotope Ratio Analysis (SIRA) for the identification of invasive species native in alien environments", das in einem internationalen Konsortium durchgeführt wird. Alle Projektpartner werden jeweils national finanziert, das Projekt 101366 stellt den österreichischen Beitrag dazu dar.

Gernot Hoch

Zwischenbericht zum Forschungsprojekt 101366

Anwendung der Stabil-Isotopenanalytik zur Identifizierung der Herkunft von invasiven Schadinsekten, die in neuen Gebieten aufgefunden werden (ISOTOPEST) (Euphresco Projekt 2017-A-250)

Aufwendige phytosanitäre Maßnahmen zur Bekämpfung invasiver Schadinsekten sollten gerechtfertigt und somit wissenschaftlich abgesichert sein. In diesem Zusammenhang zeigten erste Untersuchungen der Projektpartner, dass der Einsatz der Stabil-Isotopenanalytik die Möglichkeit eröffnet zu unterscheiden, ob aufgegriffene Exemplare potentiell invasiver Schadinsekten (etwa in Lockstofffallen) sich bereits in Europa entwickelt haben, oder ob das ausgewachsene Tier von woanders eingeschleppt wurde. Um die Methode der Stabil-Isotopenanalytik für diesen Einsatzbereich weiter entwickeln zu können, wurden im Rahmen des vorliegenden Euphresco-Projektes Insektenproben aus verschiedenen (EU und nicht-EU) Ländern untersucht, um das Potential, wie auch die Limitierungen auszuloten. Als im Detail untersuchte Modellorganismen dienten *Anoplophora glabripennis* (untersucht vom Projektpartner Fera Science Ltd.) und *Monochamus* spp. (als Vektoren des Kiefernspiltholznematoden; untersucht vom österreichischen Konsortium). Vergleichsuntersuchungen durch Fera Science Ltd. testeten, ob die Methode für weitere Arten verwendet werden kann, und eine Abschätzung ermöglichen, ob die Isotopen-Ergebnisse einer Spezies für die Untersuchung einer anderen (ähnlichen) Schadspezies verwendet werden kann.

1. Das EUPHRESCO Projekt 2017-A-250

Die Hauptziele des Euphresco-Projektes 2017-A-250 sind (aus dem Euphresco Project Proposal):

- Sammlung von Exemplaren wichtiger Baumschädlinge – insbesondere *Anoplophora glabripennis* und *Monochamus* spp. – aus verschiedenen Regionen

- Durchführung der Analyse stabiler Isotopen an den gesammelten Exemplaren und statistische Auswertung
- Verfügbarmachen der Ergebnisse

Das Schwergewicht liegt im Euphresco-Projekt in der Erfassung von Isotopen-Daten der genannten Schadorganismen aus verschiedenen Herkunftsgebieten, die für künftige Analysen als Referenz dienen können. Prinzipiell soll aber auch die Tauglichkeit dieser Methode als ein Werkzeug im Rahmen phytosanitärer Überwachungsprogramme beurteilt werden.

Das Euphresco-Projekt wird in einem Konsortium aus fünf Ländern – alle Partner sind jeweils aus unterschiedlichen Quellen national finanziert – durchgeführt. Die beteiligten leitenden Wissenschaftler und Institutionen sind:

- Dr. Katharina Heinrich, Fera Science Ltd., Vereinigtes Königreich (Koordinator)
- Dr. Micha Horacek, Department für Lithosphärenforschung, Universität Wien, Österreich
- Dr. Gernot Hoch, Bundesforschungszentrum für Wald, Wien, Österreich
- Dr. Geraldine Roux, INRAe - Zoologie Forestiere Orléans, Frankreich
- Dr. Sauro Simoni, Council for Agricultural Research and Economics, Italien
- Dr Sindhu Krishnankutty, United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, USA

Auf österreichischer Seite wurde im Laufe des Projektes Dr. Rebecca Hood-Novotny vom Department für Wald- und Bodenwissenschaften der Universität für Bodenkultur mit Zustimmung des BMLRT Teil des Konsortiums. Sie führte in ihrem Labor die Isotopenanalyse der im Laufe des Projektes von den österreichischen Partnern gesammelten Proben durch. Dies war nötig, da Dr. Horacek entgegen der ursprünglichen Planung, die Analysen nicht selbst durchführen konnte.

Das Euphresco-Projekte 2017-A-250 gliedert sich in vier Arbeitspakete:

- WP 1. Projektmanagement und Koordination
- WP 2. Sammlung von Probenmaterial
- WP 3. Analyse stabiler Isotope
- WP 4. Verfügbarmachen der Ergebnisse

Das vorliegende Projekt des BFW stellt den österreichischen Beitrag dazu dar, der gemeinsam mit Dr. Hood-Novotny (BOKU Wien) und Dr. Horacek (Universität Wien) erarbeitet wurde. Alle Arbeiten erfolgten in Abstimmung bzw. gemeinsam mit den Projektpartnern. Zur Erreichung der Ziele ist das Euphresco-Gesamtprojekt in vier Arbeitspakete aufgeteilt, zu denen die Projektpartner ungleich umfangreiche Beiträge leisten. Das österreichische Konsortium ist an allen Arbeitspaketen beteiligt. Die Arbeiten im Euphresco-Projekt verzögerten sich entgegen dem ursprünglichen Zeitplan, Einschränkungen durch die Covid-19-Situation betrafen physische Projektmeetings. Die Projektkoordinatorin suchte bei Euphresco um eine Fristerstreckung zur Legung des Endberichts an. Diese wurde genehmigt, der Endbericht wird in den kommenden Monaten erarbeitet und wird nach seiner Approbation auf der Euphresco-Webseite veröffentlicht werden. Das BMLRT stimmte einer kostenneutralen Verlängerung der Laufzeit des österreichischen Projektteils bis 31.7.2022 zu. Der hier vorgelegte Endbericht stellt insbesondere die österreichischen Arbeiten im Rahmen des Gesamtprojekts dar.

Zeitplan des österreichischen Projektteils (Projekt Nr. 101366): 11.12.2018 bis 31.7.2022

2. Ergebnisse der Arbeiten in den einzelnen Work Packages

2.1 Projektmanagement und Koordination (WP 1)

Die Koordination des Euphresco-Gesamtprojektes liegt bei Dr. Katharina Heinrich von Fera Science Ltd. Die Kommunikation im Projekt erfolgte via Email, Telefon- oder Onlinekonferenzen. Es fanden keine persönlichen Projektmeetings statt.

Die Kick-off Besprechung zum Projekt erfolgte mittels Telefonkonferenz am 11.2.2019, zu der die Koordinatorin geladen hatte. Es wurde die Aufteilung der zu untersuchenden Arten und Proben auf die Partner vereinbart und die Übernahme von Arbeiten in den Work Packages diskutiert. Der Zeitplan im Projekt wurde durch den späten Beginn geänderten Bedingungen angepasst, der Arbeitsplan musste auf die Möglichkeiten der Partner abgestimmt werden.

Weitere Projektbesprechungen im ersten Projektjahr fanden telefonisch statt. Die Covid-19 Pandemie verhinderte ein für 2020 avisiertes persönliches Meeting der Projektpartner, so dass auch im zweiten Projektjahr die Kommunikation per Telekonferenz und Email stattfinden

musste. Generell war die Zusammenarbeit durch unterschiedliche Einschränkungen für die beteiligten Partner beeinträchtigt, daher beauftragte die Koordinatorin bei Euphresco eine kostenneutrale Verlängerung des Projektes. Neues Enddatum ist der 30.9.2022.

Ein für Mai 2022 avisiertes Online-Projektmeeting musste von der Koordinatorin abgesagt werden. Es wurde vereinbart via Email am gemeinsamen Bericht für Euphresco zu arbeiten, ein abschließendes Online-Meeting wird wenn nötig ad hoc einberufen.

Nachdem es Dr. Horacek an der HBLFA Francisco Josephinum nicht möglich war, die Proben für den österreichischen Projektteil selbst zu analysieren, erklärte sich Dr. Hood-Novotny dankenswerter Weise bereit, als Partner in das laufende Projekt einzusteigen. Der Fördergeber stimmte dieser kostenneutralen Änderung zu, ebenso einer kostenneutralen Verlängerung um sechs Monate. Diese war nötig, damit die Proben nach dieser ungeplanten Änderung vollständig analysiert werden konnten.

2.2 Sammlung von Probenmaterial (WP 2)

Ziel dieses Arbeitspaketes war die Sammlung von Probenmaterial (adulte Käfer) aus verschiedenen Regionen. Projektpartner Fera organisierte und analysierte Probenmaterial, das im Rahmen von Importkontrollen durch USDA-APHIS (Partner 6) aufgegriffen wurde. Mehrere Cerambyciden-Arten, die beim Kick-off als wichtig identifiziert wurden, gingen an Fera zur Durchführung der Isotopenanalyse. Das BFW konzentrierte die Sammlung und Analyse auf Exemplare von *Monochamus* spp. Die Käfer dieser Gattung fungieren als Vektor für den gefährlichen Kiefernholznematoden, einen prioritären Schadorganismus in der EU. Fachkolleg*innen aus verschiedenen europäischen Ländern reagierten auf die Anfrage und sandten Sammlungsmaterial zu. Alle Exemplare waren Fänge aus dem Freiland (häufig aus Lockstofffallen). Sie waren entweder in Ethanol oder tiefgekühlt gelagert. Versandt wurden alle Exemplare feucht in Ethanol. Tabelle 1 zeigt die *Monochamus*-Arten und Herkünfte, die für die Untersuchung akquiriert werden konnten. Sehr interessantes und umfangreiches Material wurde Dr. Roux vom Projektpartner INRAE (FR) zur Verfügung gestellt. Die Käfer aus verschiedenen europäischen Regionen wurden zuvor in deren Labor für phylogeographische Analysen verwendet. Weiteres Material wurde uns von Dr. Hugo Mas vom Forest Health Laboratory der Region Valencia (ES), Dr. Pedro Naves vom INIAV (PT) und Prof. Martin Schroeder und Dragos Cocos von der Swedish University of Agricultural Sciences (SE) zur

Verfügung gestellt. Käfer, die in Österreich zur Begründung der Zuchten am BFW (siehe unten) im Freiland gefangen wurden (Diana Mittermayr, BFW), gingen ebenfalls in die Analysen ein.

Tabelle 1: Herkunft, Wirtsbaumart (aufgrund der am Standort dominanten Arten), *Monochamus*-Art, Einsender*in der Exemplare; in den meisten Fällen wurden mehrere Exemplare pro Lokalität zur Verfügung gestellt und analysiert.

Land	Lokalität	Koordinaten (B, L)		Wirtsbaum	<i>Monochamus</i>	Einsender*in
Portugal	Troia	38,47811	-8,8875	<i>P. pinaster</i>	<i>galloprovincialis</i>	P. Naves
	Troia	38,47811	-8,8875	<i>P. pinaster</i>	<i>galloprovincialis</i>	
Portugal	Santarem	39,1	-8,57	k. A.	<i>galloprovincialis</i>	G. Roux
	Tondelo	40,49	-8,09	k. A.	<i>galloprovincialis</i>	
	Redondelo	41,71	-7,55	k. A.	<i>galloprovincialis</i>	
	Odeceixe	37,43	-8,77	k. A.	<i>galloprovincialis</i>	
	Castro Daire	40,92	-7,92	k. A.	<i>galloprovincialis</i>	
Spainen	Guardamar (Alicante)	38,10098	-0,65167	<i>P. pinea</i>	<i>galloprovincialis</i>	H. Mas
	Crevillent (Alicante)	38,28434	-0,78017	<i>P. halepensis</i>	<i>galloprovincialis</i>	
	Biar (Alicante)	38,65436	-0,71733	<i>P. pinea</i>	<i>galloprovincialis</i>	
	Agres (Valencia)	38,77412	-0,52126	<i>P. halepensis</i>	<i>galloprovincialis</i>	
	Valencia (Valencia)	39,34283	-0,32073			
	Puebla de San Miguel (Valencia)	40,07046	-1,10427	<i>P. sylvetris</i>	<i>galloprovincialis</i>	
	Puebla de San Miguel (Valencia)	40,02169	-1,12888	<i>P. nigra</i>	<i>galloprovincialis</i>	
	Sinarcas (Valencia)	39,78451	-1,20617	<i>P. pinaster</i>	<i>galloprovincialis</i>	
	Cabanès (Castellon)	40,10113	0,03557	<i>P. pinaster</i>	<i>galloprovincialis</i>	
	Vistabella del M. (Castellon)	40,23654	-0,34752	<i>P. sylvestris</i>	<i>galloprovincialis</i>	
	Vistabella del M. (Castellon)	40,34216	-0,29695	<i>P. nigra</i>	<i>galloprovincialis</i>	
	Vistabella del M. (Castellon)	40,25748	-0,35636	<i>P. pinaster</i>	<i>galloprovincialis</i>	
	Confrides (Alicante)	38,65225	-0,26635	<i>P. nigra</i>	<i>galloprovincialis</i>	
	Jerica (Castellon)	39,87645	-0,53882	<i>P. halepensis</i>	<i>galloprovincialis</i>	
	Jerica (Castellon)	39,87027	-0,58472	<i>P. halapensis</i>	<i>galloprovincialis</i>	
	Morella (Castellon)	40,52567	-0,14666	<i>P. nigra</i>	<i>galloprovincialis</i>	
	Altura (Castellon)	39,82665	-0,65087	k. A.	<i>galloprovincialis</i>	

Land	Lokalität	Koordinaten (B, L)		Wirtsbaum	<i>Monochamus</i>	Einsender*in
Spanien	Olvan	42,05	1,88	k. A.	<i>galloprovincialis</i>	G. Roux
	Jaca	42,54	-0,64	k. A.	<i>galloprovincialis</i>	
	Canfranc	42,71	-0,52	k. A.	<i>galloprovincialis</i>	
	Itziar	43,28	-2,32	k. A.	<i>galloprovincialis</i>	
	Etchalar	43,22	-1,63	k. A.	<i>galloprovincialis</i>	
	Irun	43,33	-1,91	k. A.	<i>galloprovincialis</i>	
	Ourense	42,26	-7,85	k. A.	<i>galloprovincialis</i>	
Frankreich	Ospedale	41,39	9,11	k. A.	<i>galloprovincialis</i>	G. Roux
	Fournel	44,9	6,6	k. A.	<i>galloprovincialis</i>	
	Venelles	43,37	5,3	k. A.	<i>galloprovincialis</i>	
	Vayrieres	44,61	1,34	k. A.	<i>galloprovincialis</i>	
	Argeles	42,52	3,06	k. A.	<i>galloprovincialis</i>	
Serbien	Belgrad	44,71	20,4	k. A.	<i>galloprovincialis</i>	G. Roux
Bosnien	Sarajevo	43,88	18,34	k. A.	<i>galloprovincialis</i>	G. Roux
Macedonien	Bitola	41,01	21,32	k. A.	<i>galloprovincialis</i>	G. Roux
Schweden	Block 5	60,38806	17,63444	<i>P. abies/P. sylv.</i>	<i>sutor</i>	D. Cocos
	Block 8	60,77072	16,88228	<i>P. abies/P. sylv.</i>	<i>sutor</i>	
	Block 12	61,16983	16,62414	<i>P. abies/P. sylv.</i>	<i>sutor</i>	
	Block 14	60,42389	18,43283	<i>P. abies/P. sylv.</i>	<i>sutor</i>	
Schweden	Block 11	61,11567	16,91933	<i>P. sylvestris</i>	<i>galloprovincialis</i>	D. Cocos
	Block 14	60,42389	18,43283	<i>P. sylvestris</i>	<i>galloprovincialis</i>	
	Block 17	60,53478	17,75817	<i>P. sylvestris</i>	<i>galloprovincialis</i>	
	Block 20	60,76894	17,28822	<i>P. sylvestris</i>	<i>galloprovincialis</i>	
Österreich	Naßwald	47,762007	15,670806	<i>P. abies</i>	<i>sartor</i>	D. Mittermayr
	Steinfeld	47,76667	16,15417	<i>P. nigra</i>	<i>galloprovincialis</i>	D. Mittermayr

Am BFW wurde eine Zucht von *Monochamus* spp. aufgebaut. Dazu wurden im Sommer 2019 im Raxgebiet (Naßwald, Niederösterreich) Mehrtrichterfallen, die mit dem spezifischen *Monochamus*-Lockstoff Galloprotect (SEDQ, Spanien) beködert wurden, installiert. Die Fallen wurden täglich kontrolliert und lebende *Monochamus sartor* Exemplare eingesammelt. Am BFW wurden diese in einem Freilandinsektarium paarweise in Käfigen auf Fichtenstammstücke zur Kopulation und Eiablage gesetzt. Die Fichten stammten aus dem

Waldgebiet, in dem auch die Fallen aufgestellt waren. Diese Ansätze dauerten den Sommer hindurch. Nach ihrem Tod wurden die Käfer bei -20°C gelagert. Zu drei Zeitpunkten wurden im Winterhalbjahr *Monochamus*-Larven aus den Stammstücken gewonnen und ebenso bei -20°C bis zur Isotopenanalyse gelagert.

Im Sommer 2020 schlüpfte nur ein adulter Käfer aus den Stammstücken, der ebenso gelagert wurde. Die Stammstücke wurden weiter im Insektarium unter geschützten Freilandbedingungen inkubiert. Im Sommer 2020 wurden im niederösterreichischen Steinfeld adulte *Monochamus galloprovincialis* nach oben beschriebener Methode gefangen. Diesen wurden Kiefernstammstücke zur Eiablage angeboten. Im Sommer 2021 fand kein Schlupf aus den Stammstücken statt. Daher wurden alle Stammstücke im Winter 2021/22 seziiert. Lebende Larven wurden entnommen und eingefroren. Vor der Analyse wurden alle Exemplare (Adulte sowie Larven) in Ethanol transferiert, um zu den Freilandexemplaren vergleichbare Bedingungen zu haben.

2.3 Analyse stabiler Isotope (WP 3)

a) Methode der Isotopenanalyse

Alle am BFW in Ethanol gelagerten Insektenproben wurden zur Analyse an die BOKU in Tulln transferiert. Dort erfolgte die Aufbereitung und Messung. Von den Käfern wurde jeweils eine einzelne Flügeldecke (Elytron) entfernt und für die Analyse mit ähnlichen Probengrößen vorbereitet, wobei die Proben die gleiche Geometrie aufwiesen, d. h. die vordere linke Seite der Flügeldecke wurde beprobt. Nach der Entnahme aus dem Ethanol wurden die Flügeldecken entfettet, indem sie 2 Stunden lang in 1 ml 95 % Aceton eingeweicht, dann dreimal mit Reinstwasser abgespült und im Trockenschrank bei 40°C getrocknet wurden. Bei Larven wurde eine Probe des Abdomens entnommen. Die Holzproben wurden mit einem Dremmel-Bohrer aus dem Stollen entnommen, ein Entfettungsverfahren wurde für diese Proben nicht eingeleitet.

Der Grundgedanke war, die Probenvorbereitung so einfach wie möglich zu gestalten; gleichzeitig galt es mögliche Kontaminationen zu vermeiden und die geringe Probengröße zu berücksichtigen. Für die Wasserstoffisotopenanalyse wurden 0,2-mg-Proben in dreifacher, vierfacher oder fünffacher Ausführung aus demselben Probenstück entnommen, in Silberkapseln eingewogen und in einem Exsikkator mindestens achtundvierzig Stunden lang

mit vergleichbaren Kasein- und USGS Indian Hair-Standards äquilibriert, um die Berechnung der nicht austauschbaren Wasserstoffisotopenwerte zu ermöglichen. Proben und Standards wurden für die Einführung in das Massenspektrometer mit einem Hochtemperatur-Elementaranalysesystem (HT/EA) (Thermo Fisher Bremen, Deutschland) mit einem Glaskohlenstoff-Verbrennungsofen vorbereitet, um eine Hochtemperaturpyrolyse bei 1430 °C zu erreichen. Das Trägergas war Helium, und die Peaks wurden im kontinuierlichen Flussmodus in das Isotopenverhältnis-Massenspektrometer (Delta Plus, Thermo Finnigan Bremen, Deutschland) geleitet. Zur Berechnung der Delta-Werte und des nicht austauschbaren Wasserstoffs wurden mit den Proben eine ganze Reihe interner Sekundärstandards (Standards, die gegen VSMOW und VSLAP gemessen wurden) und externe internationale Primärstandards (NBS22 und IAEA-CH7) verwendet.

Die Isotopenwerte wurden als Teile pro Tausend (‰) oder δ Abweichung von den international anerkannten Standards (V-SMOW: Vienna- Standard Mean OceanWater; Gröning, 2004) ausgedrückt, und nicht austauschbarer Wasserstoff wurde auf einer V-SMOW-Skala auf der Grundlage der von USGS Indian Hair korrigierten Werte angegeben. Diese vergleichende Äquilibrierungsmethode wurde verwendet, um alle Ergebnisse zu normalisieren. In allen organischen Materialien gibt es einen festen Anteil an Wasserstoffionen, die mit dem Wasserstoff der Umgebung austauschbar sind. Um diesen Hintergrund zu berücksichtigen und den nicht austauschbaren Wasserstoff zu berechnen, haben wir zwei international anerkannte Standards, Kasein und USGS Indian Hair, zur Korrektur verwendet, die beide international vereinbarte Werte und bekannte Anteile an austauschbarem Wasserstoff aufweisen. Die Standardabweichung der wiederholten Analysen des internen Standards war durchweg $< 3,0$ ‰.

Eine Regressionsanalyse nach Hungate et al. (2016) wurde verwendet, um den vorhergesagten Wasserstoffisotopenwert des Niederschlags auf der Grundlage der nicht austauschbaren Wasserstoffwerte der von uns gesammelten Käfer zurückzurechnen. Wir verglichen diese Werte mit den langjährigen mittleren jährlichen Wasserstoffisotopenwerten von Leitungswasser aus dem Global Network of Isotopes in Precipitation (GNIP http://www-naweb.iaea.org/napc/ih/IHS_resources_gnip.html) und der Wasserisotopen-Website, die die Eingabe von Längen- und Breitengraddaten zur Vorhersage von Wasserisotopensignaturen ermöglicht (http://wateriso.utah.edu/waterisotopes/pages/data_access/oipc.html).

Es wurde angenommen, dass das chitindominierte Strukturmaterial in den Flügeldecken geringere Umsatzraten aufweist als der gesamte Körper, was durch die Daten von Hungate et al. (2016) für Käfer bestätigt wurde. Auf der Grundlage dieser allgemeinen Informationen konnten wir ziemlich sicher sein, dass die Signaturen die Herkunft der Käfer widerspiegeln, wenn es sich um frisch geschlüpfte Käfer handelt. Diese Annahme muss in einfachen, aber

geeigneten Laborexperimenten vollständig überprüft werden, aber angesichts der Ergebnisse anderer Käferexperimente (Hungate et al., 2016) scheint es wahrscheinlich, dass diese Annahme zutrifft.

Der Standardfehler der Deuteriummessung betrug weniger als 0,5‰ auf der Grundlage des IAEA-CH7-Standards.

Die Daten aus Waterloo sind ein gewichteter Mittelwert des gesamten Jahres, was die Werte in Richtung sehr negativer Schneewerte verzerren würde. Wir gehen davon aus, dass die Käferaktivität im Winter bei Schneefall gering ist, die Vegetation in dem Gebiet jedoch in gewissem Maße von der Schneeschmelze abhängig ist.

Dies verdeutlicht eine der Schwierigkeiten beim Vergleich von Käferisotopendaten mit einer Wasserdatenbank. Idealerweise sollten die Daten mit den Wasserisotopendaten der Vegetationsperiode verglichen werden, was auch die Kenntnis der Niederschlagsmenge voraussetzen würde, um gewichtete Mittelwerte der Isotopenwerte zu erhalten. Offensichtlich ist dies möglich, würde aber einen viel größeren Zeitaufwand für die Datensuche und -überprüfung sowie spezielle Standortanmeldungen und -genehmigungen erfordern. Außerdem wäre es nur dann sinnvoll, wenn wir die Koordinaten und die Höhe der gesammelten Proben genau kennen würden.

b) Ergebnisse der Isotopenanalyse

Die untersuchten *Monochamus galloprovincialis*-Proben zeigen eine Schwankungsbreite der Isotopen-Ergebnisse von ca. -115 bis ca. -45 ‰ V-SMOW für d2H, ca. -27 bis -21 ‰ V-PDB für d13C und ca. -11 bis + 6 ‰ für d15N gegen Luft (N-Air) (siehe Abbildungen 1 und 2). Die Proben aus Spanien liegen zwischen -90 und -50 ‰ für d2H, zwischen ca. -27 und -21 ‰ für d13C und ca. -11 und +6 ‰ für d15N, das heißt, bis auf d2H bilden die spanischen Proben die Gesamtvariation (die Höchst- und Niedrigstwerte) für d13C und d15N ab (Abbildungen 3 und 4). Die Proben aus Portugal liegen zwischen ca. -70 und -45 ‰ für d2H, -25,5 und -22 ‰ für d13C und -7 bis +5 ‰ für d15N (Abbildungen 5 und 6).

Abbildung 1: d2H- und d13C-Werte der untersuchten *Monochamus*-Proben von der Iberischen Halbinsel, Frankreich, Österreich, dem Westbalkan und Schweden

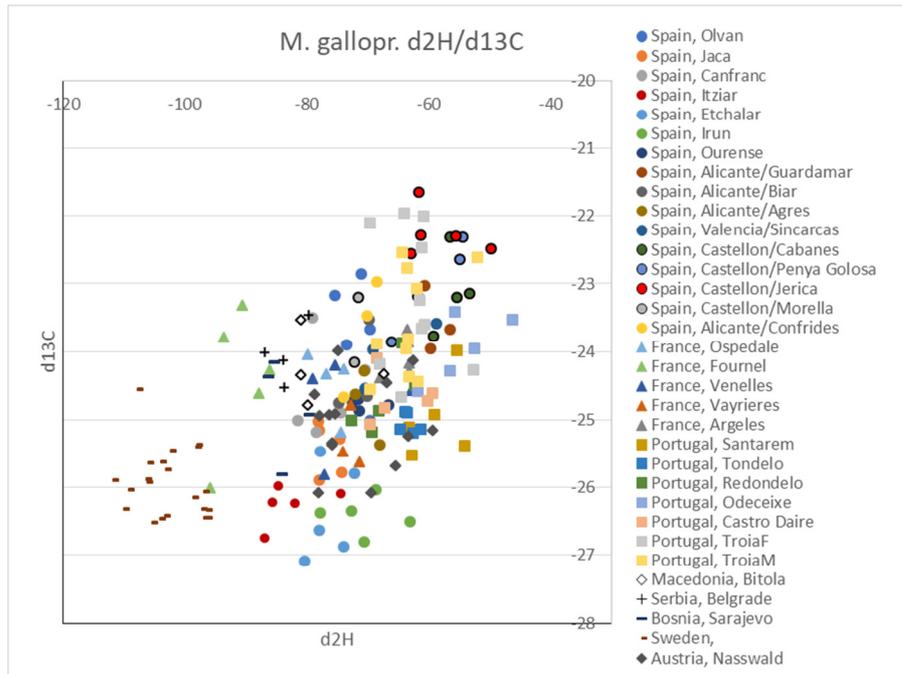


Abbildung 2: d2H- und d15N-Werte der untersuchten *Monochamus*-Proben von der Iberischen Halbinsel, Frankreich, Österreich, dem Westbalkan und Schweden

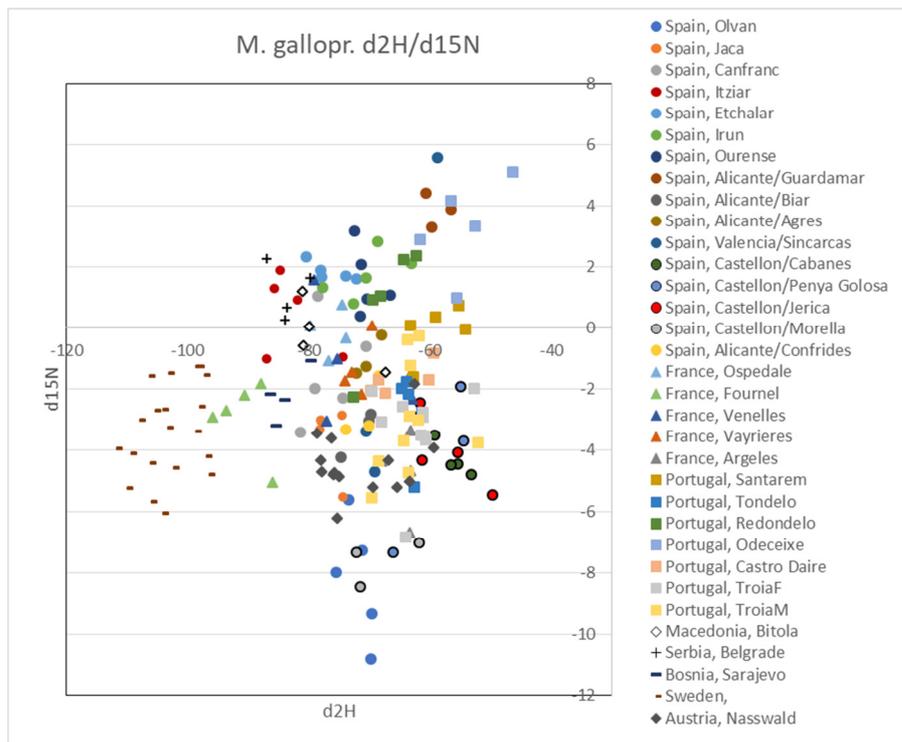


Abbildung 3: d2H- und d13C-Werte der untersuchten *Monochamus galloprovincialis*-Proben aus Spanien

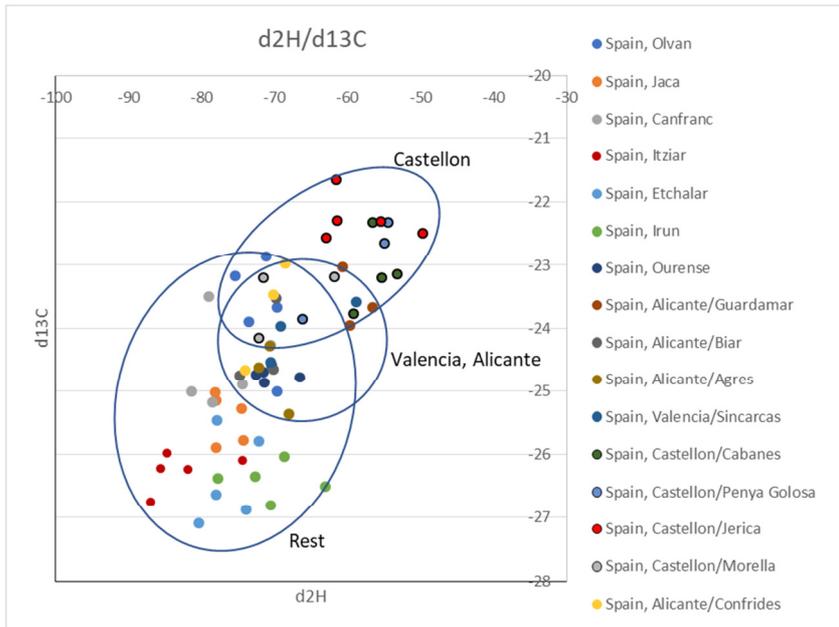


Abbildung 4: d2H- und d15N-Werte der untersuchten *Monochamus galloprovincialis*-Proben aus Spanien

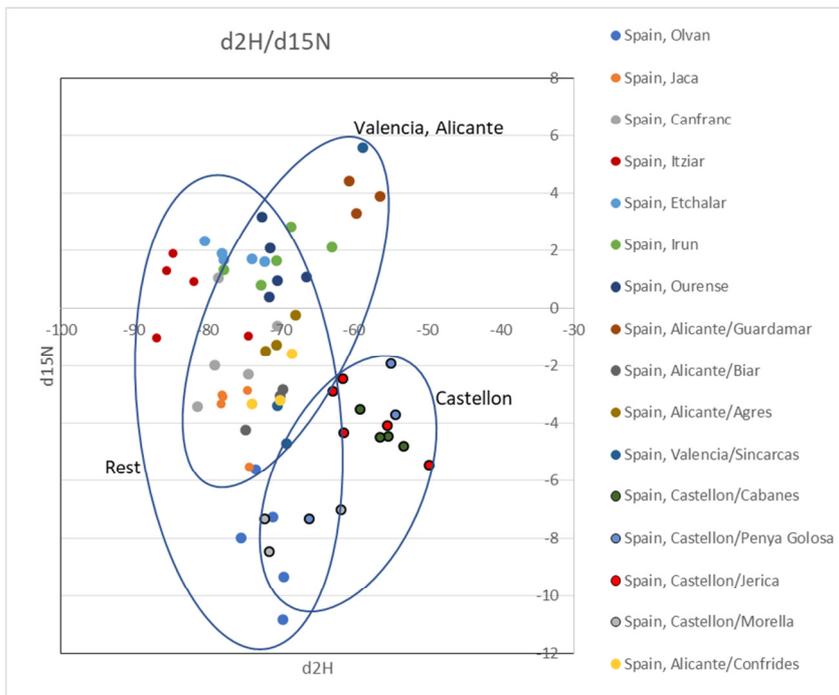


Abbildung 5: d2H- und d13C-Werte der untersuchten *Monochamus galloprovincialis*-Proben aus Portugal

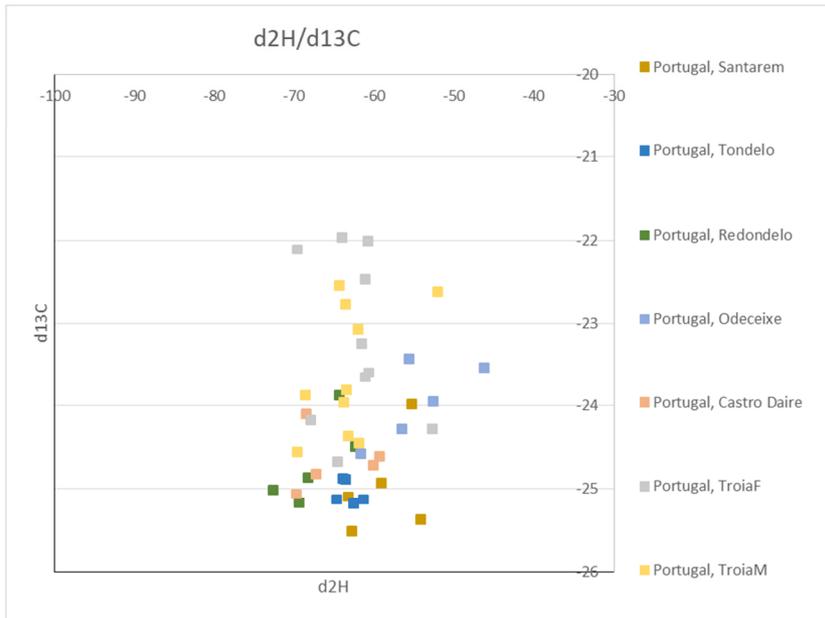
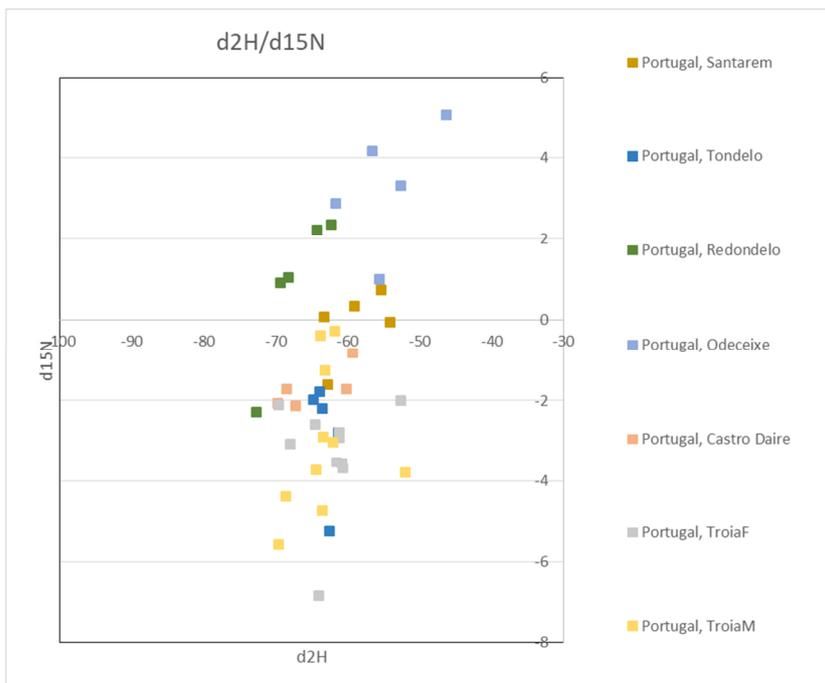


Abbildung 6: d2H- und d15N-Werte der untersuchten *Monochamus galloprovincialis*-Proben aus Portugal



Die Proben aus Frankreich liegen zwischen ca. -95 und -60 ‰ für d2H, -26 und -23 ‰ für d13C und -7 und +2 ‰ für d15N (Abbildungen 7 und 8), und die Proben aus Schweden zwischen -115 und -95 ‰ für d2H, zwischen -27 und -24 ‰ für d13C und zwischen -7 und 0 ‰ für d15N (Abbildung 9 und 10). Die Proben aus Österreich befinden sich im Bereich zwischen -80 und -60 ‰ für d2H, -26 bis -24 ‰ für d13C und -6 und -2 ‰ für d15N (Abbildung 9 und 10). Die Proben vom Westbalkan schwanken zwischen -85 und -65 ‰ für d2H, -26 und -23,5 ‰ für d13C und -3 und +2 ‰ für d15N (Abbildung 9 und 10). Die untersuchten *Monochamus sutor*-Proben aus Schweden, die zum Vergleich zur Verfügung standen, zeigen etwa die gleiche Variationsbreite wie *M. galloprovincialis* (Abbildungen 11 und 12); für d13C zeigen sie einen etwas höheren Höchstwert und gering höhere Werte.

Für die Isotopen der Elemente C und H erkennt man eine sehr schwache positive Korrelation, während für die Isotope von H und N keine Korrelation erkennbar sind, und somit für letztere Isotopenparameter keine Zusammenhänge und Abhängigkeiten zu existieren scheinen.

Die Isotopenanalyse der *Monochamus*-Larven brachte sehr stark schwankende und teils extrem ausreißende Werte. Hier dürfte die Probenmatrix nicht geeignet gewesen sein, das C:N-Verhältnis in den Proben deutet auf ungenügende Lipidextraktion. So können leider keine Zusammenhänge zwischen den Elternkäfern und deren Nachkommen aus der angesetzten Zucht von *Monochamus sutor* überprüft werden. Auch ein Vergleich mit dem Brutholz ist daher nicht sinnvoll. Eine wichtige Erkenntnis ist, dass auch bei Larven die Probe auf chitiniertes Material (Kopfkapsel mit Mandibeln) beschränkt werden muss. Die geringe Größe könnte hier eine Herausforderung darstellen.

Abbildung 7: d2H- und d13C-Werte der untersuchten *Monochamus galloprovincialis*-Proben aus Frankreich

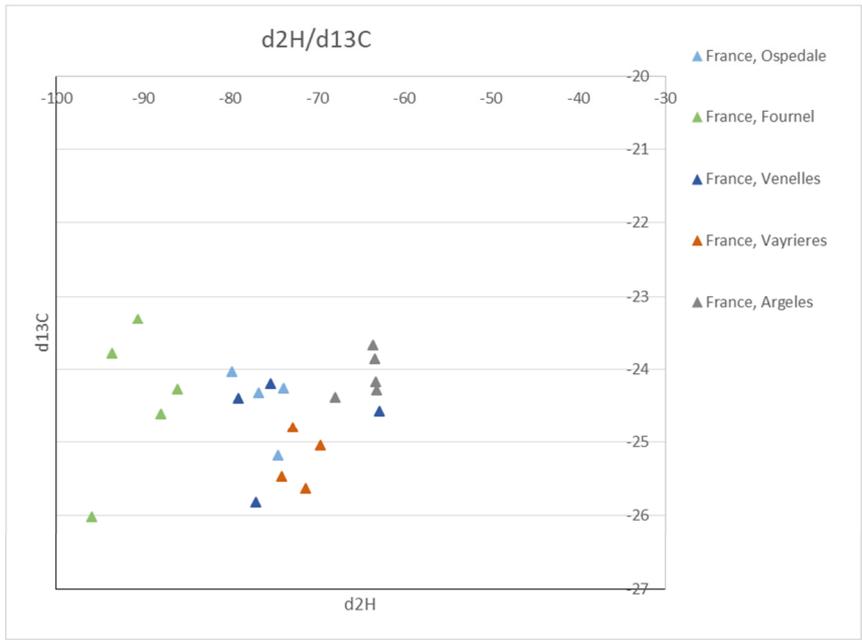


Abbildung 8: d2H- und d15N-Werte der untersuchten *Monochamus galloprovincialis*-Proben aus Frankreich

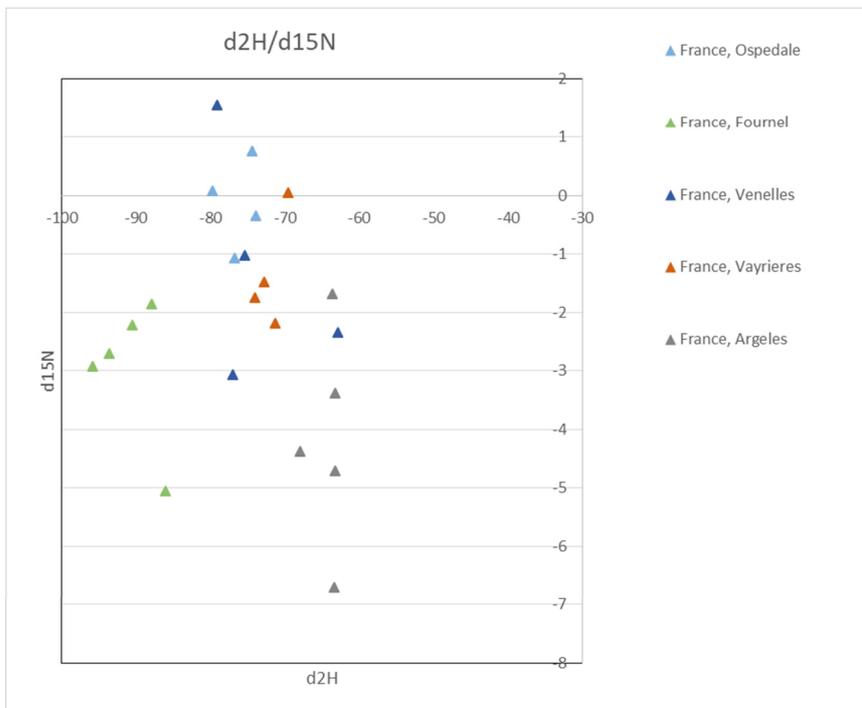


Abbildung 9: d2H- und d13C-Werte der untersuchten *Monochamus*-Proben aus Schweden, Österreich und vom Westbalkan

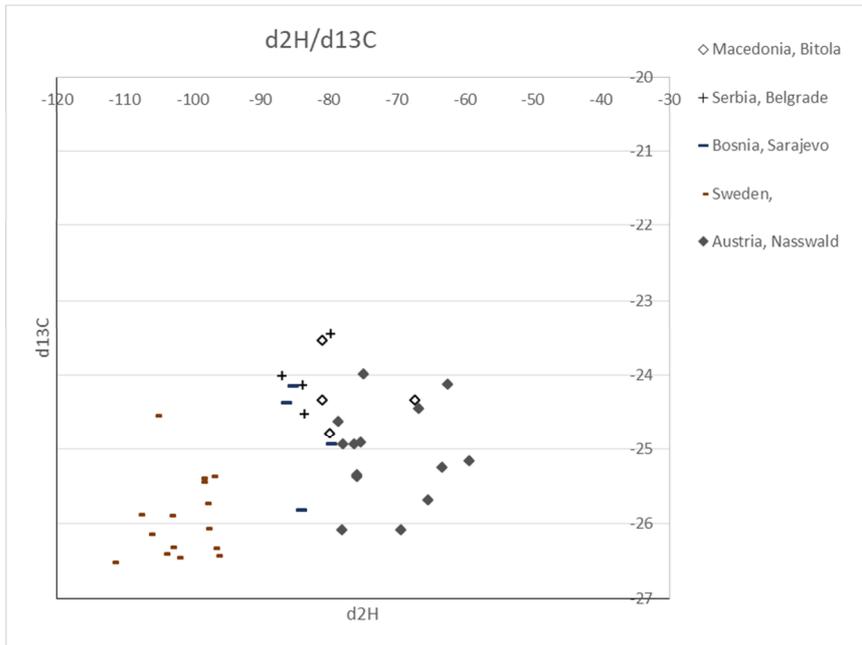


Abbildung 10: d2H- und d15N-Werte der untersuchten *Monochamus*-Proben aus Schweden, Österreich und vom Westbalkan

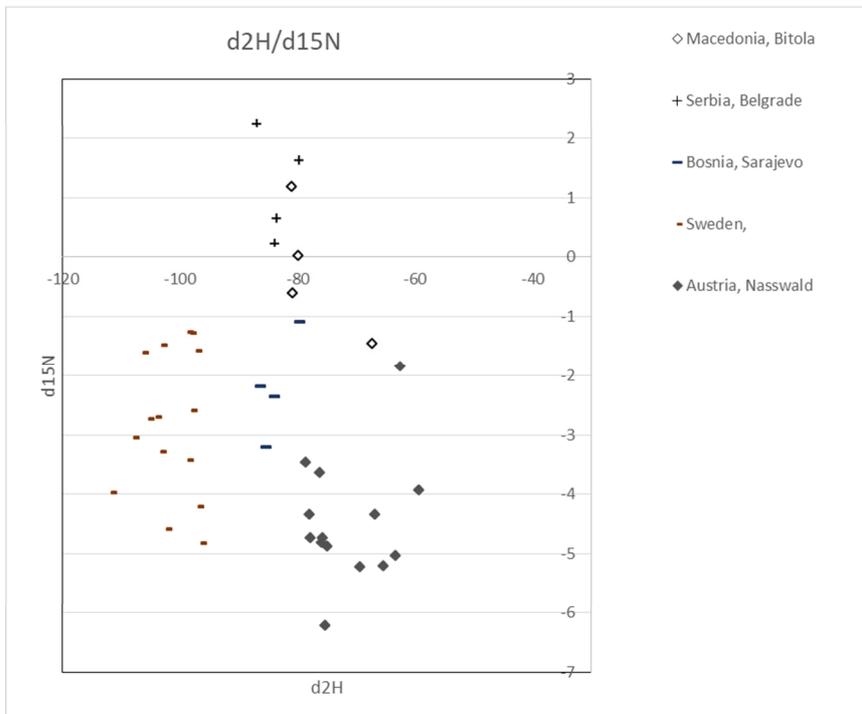


Abbildung 11: Vergleich der d2H- und d13C-Werte der untersuchten *Monochamus sutor* und *Monochamus galloprovincialis* aus Schweden

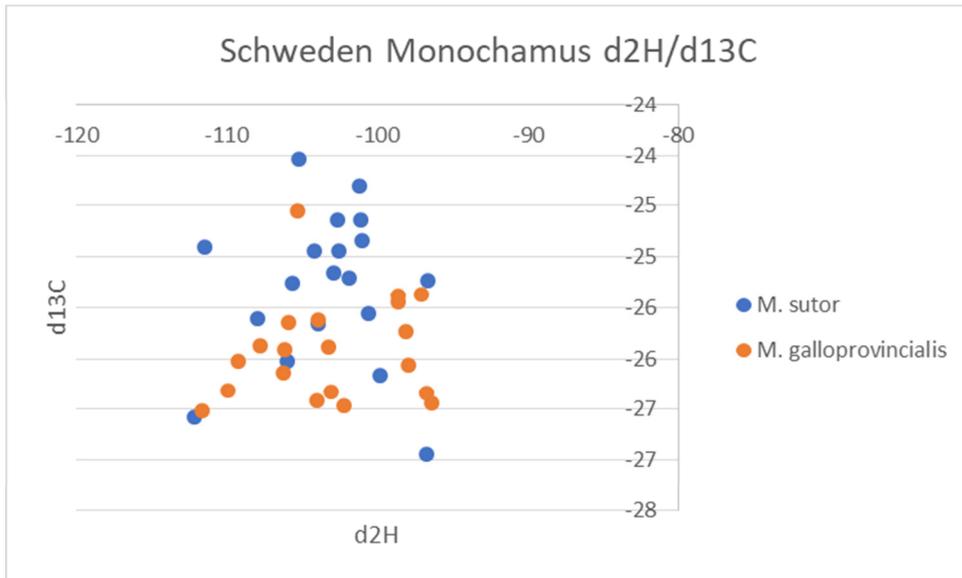
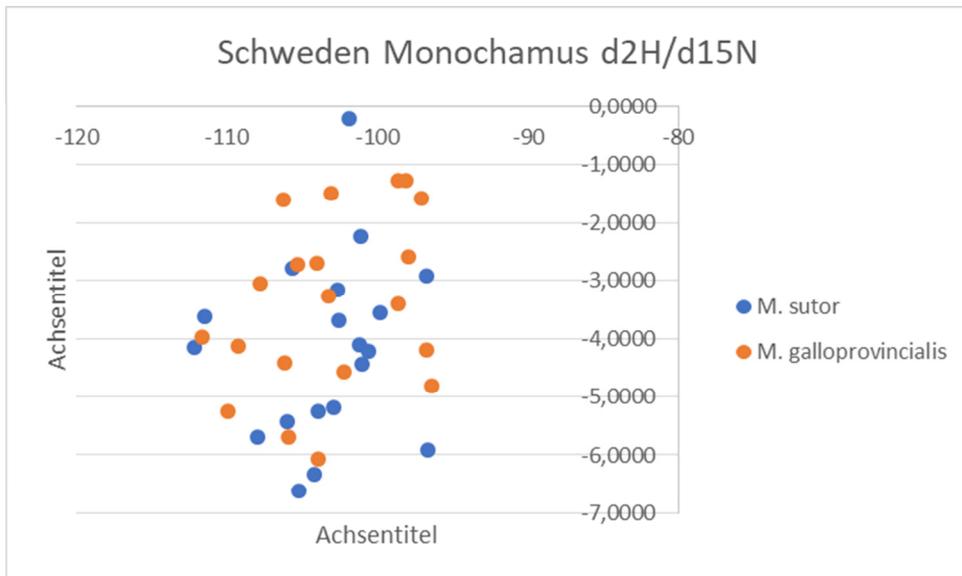


Abbildung 12: Vergleich der d2H- und d15N-Werte der untersuchten *Monochamus sutor* und *Monochamus galloprovincialis* aus Schweden



c) Diskussion der Isotopenanalyse

Die Isotopie der *Monochamus*-Individuen ist bestimmt von der Nahrung, zu der die jeweilige Larve Zugang hatte, und somit abhängig vom Isotopenmuster der Bäume, von denen die Larven sich ernährt hatten. Wie zu erwarten, zeigen die Proben aus höheren geographischen Breiten (Schweden) deutlich niedrigere d2H-Werte als Proben aus niedrigeren Breiten. Dies ist durch den Temperatur-Effekt gegeben, der eine bessere Auftrennung zwischen leichten und schweren Isotopen bei der Verdampfung von Wasser bewirkt und somit in höheren Breiten Niederschlag mit niedrigeren Isotopenverhältnissen (weniger schweren Isotopen im Niederschlag) als bei Niederschlag in wärmeren Regionen. Ebenfalls etwas niedrigere d2H-Werte weisen die südosteuropäischen Proben auf. Dieses Phänomen ist durch den Kontinental-Effekt (der Niederschlag bekommt immer niedrigere Werte je weiter entfernt eine Region vom Meer ist), sowie der Tatsache, dass in diesen Regionen der Winterniederschlag in Form von Schnee eine große Bedeutung für den Wasserhaushalt hat. Die österreichischen Proben zeigen eine recht große Variationsbreite, obwohl die Proben aus einer geographisch kleinen Region stammen. Dies ist überraschend und deutet auf heterogene Umweltbedingungen hin in Bezug auf Wasserherkunft und somit der jeweiligen Standorte, von denen die Proben stammen. Proben aus Spanien und Frankreich weisen eine Variationsbreite von ca. 40 ‰-Punkten auf. Die dürfte die Variation der Standorte von Tiefland- bis Bergwald widerspiegeln. Proben aus Portugal weisen eine relativ geringe Variationsbreite von ca. 20 ‰-Punkten bei d2H auf, und zeigen somit deutlich homogenere Werte.

Die Kohlenstoff-Isotopie (d13C) ist ein Indikator der Wasserverfügbarkeit für die Bäume, von denen sich die *Monochamus*-Larven ernährt haben. Niedrige d13C-Werte weisen auf ausreichend Wasser und somit die Abwesenheit von Trockenstress hin. Höhere d13C-Werte zeigen Trockenstress an. Es zeigt sich, dass in jedem Land, aus dem Proben unterschiedlicher Standorte untersucht wurden, eine gewisse Schwankungsbreite bei den d13C-Werten existiert, was Hinweise auf Unterschiede in der Wasserverfügbarkeit für die jeweiligen Bäume gibt. Die höchsten Werte finden sich in den Proben aus Portugal und Spanien, gefolgt von Proben aus Frankreich und Südosteuropa. Die schwedischen Proben zeigen durchwegs niedrige Werte und somit Abwesenheit von signifikantem Trockenstress, ebenso wie die Proben aus einigen spanischen Lokalitäten (Itziar, Irun, Etchalar an der Baskischen Küste bzw. Pyrenäen). In Portugal weisen die Lokalitäten Santarem und Tondelo niedrige d13C-Werte auf, in Frankreich Vayrieres. In Spanien zeigen Castellon und Alicante-Valencia die höchsten d13C-Werte, und somit den stärksten regionalen Wasserstress (Abbildung 3).

Die ^{15}N -Isotopie der untersuchten Käferproben wird von der Isotopie der Wirtsbäume bestimmt. Es scheint hier jedoch teilweise sehr große Variationen innerhalb der Regionen zu geben. In Spanien kann jedoch gezeigt werden, dass die Region Castellon einerseits und die Region Alicante-Valencia andererseits kaum Überlappungen aufweisen (in Kombination mit der ^2H -Isotopie, siehe Abbildung 4). Auch in Portugal und Frankreich können einige Herkünfte anhand ihrer ^{15}N -Isotopie voneinander unterschieden werden (Abbildung 6, 8).

Die erste Auswertung der Ergebnisse zeigt somit, dass teilweise eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Ländern und eine regionale Differenzierung innerhalb eines Landes möglich ist. Andererseits zeigen sich auch deutliche Überlappungen der Ergebnisse. Dies stimmen mit Ergebnissen einer detaillierten, statistischen Analyse erster, bereits vorliegender Proben von *Monochamus*-Arten, die im Rahmen dieses Projektes durchgeführt wurde, und aus der ein Manuskript in Vorbereitung ist (siehe 2.4). Diese Analyse zeigte eine gewisse Überlappung der Werte von Proben aus Österreich und Polen, während Proben aus Portugal deutlich getrennt waren. Besonders deutlich war die Differenzierung zu Proben aus Sibirien.

Eine detaillierte, statistische Evaluierung der hier gezeigten Daten wird die Möglichkeiten der Unterscheidungen deutlich vergrößern, und stellt ein nächstes Ziel unserer Arbeit im Euphresco Gesamtprojekt dar. Diese vertiefenden Analysen werden durchgeführt, wenn die Ergebnisse aller Projektpartner im Euphresco Projekt vorliegen und zusammengeführt werden können.

2.4 Verbreitung der Ergebnisse (WP 4)

Die im Euphresco-Projekt geplanten Materialien zur Verbreitung der Ergebnisse an Stakeholder können erst bei Abschluss des Gesamtprojektes produziert werden. Basierend auf den Ergebnissen der Isotopenanalysen im Vereinigten Königreich und in Österreich sollen gemeinsam Handbücher über den Einsatz der Analyse in phytosanitären Überwachungsprogrammen verfasst werden.

Ebenso ist die Verbreitung von Ergebnissen aus dem Projekt an nicht-wissenschaftliche Interessenten, wie nationale Pflanzenschutzdienste erst nach Vorliegen und gemeinsamer Analyse aller Ergebnisse im Rahmen des Euphresco-Gesamtprojekts sinnvoll. Hierzu werden Medien von Euphresco bzw. EPPO genutzt und die Methode bei Sitzungen der Pflanzenschutzdienste vorgestellt.

Das im letzten Zwischenbericht angekündigte Manuskript: Horacek M., Hoch G., Kacprzyk M., Akulov E., Kirichenko N., Naves P.: "Stable isotope analysis as a promising tool to discriminate between the geographic populations of *Monochamus* species (Coleoptera, Cerambycidae), the potential vectors of the pinewood nematode" wurde gründlich überarbeitet und soll bei einer SCI-gelisteten Zeitschrift eingereicht werden.

3. Kurzfassung

Das vorliegende Forschungsprojekt 101366 stellt den österreichischen Beitrag zum EUPHRESKO Projekt 2017-A-250 "Use of Stable Isotope Ratio Analysis (SIRA) for the identification of invasive species native in alien environments" dar, das in einem internationalen Konsortium (jeweils mit eigener, nationaler Finanzierung) durchgeführt wird. Dazu wurden verschiedene phytosanitär bedeutende, rinden- und holzbrütende Käfer mit Ursprung in verschiedenen Regionen gesammelt und einer Analyse stabiler Isotopen unterzogen. Der österreichische Projektteil konzentrierte sich auf Arten der Bockkäfergattung *Monochamus*, die als Überträger des Kiefernholznematoden von prioritärer Bedeutung sind. Käfer aus neun europäischen Ländern wurden analysiert. Die untersuchten *Monochamus galloprovincialis*-Proben zeigen eine Schwankungsbreite der Isotopen-Ergebnisse von -115 bis -45 ‰ für d2H, -27 bis -21 ‰ für d13C und -11 bis + 6 ‰ für d15N. Proben aus höheren geographischen Breiten (Schweden) hatten deutlich niedrigere d2H-Werte als Proben aus niedrigeren Breiten. Proben aus Spanien und Frankreich weisen eine Variationsbreite von ca. 40 ‰-Punkten auf, die unterschiedlichen Regionen (Meeresnähe bis Bergwald) widerspiegelnd. Portugal weist eine relativ geringe Variationsbreite von ca. 20 ‰-Punkten bei d2H auf. Die Ergebnisse zeigen, dass teilweise – bei bestehenden Überlappungen – eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Ländern und auch eine regionale Differenzierung innerhalb eines Landes möglich ist. Eine tiefergehende statistische Analyse wird im Rahmen des noch laufenden Euphresco-Gesamtprojektes erfolgen, wenn die Ergebnisse aller Projektpartner vorliegen. Dann wird auch eine generelle Schlussfolgerung zur Methode möglich sein.

4. Abstract

Research Project 101366 is the Austrian contribution to the Euphresco-Project 2018-A-250 "Use of Stable Isotope Ratio Analysis (SIRA) for the identification of invasive species native in alien environments", which has been carried out in an international consortium (with individual, national funding). Bark and wood boring beetles from various geographic origins were subjected to the analysis of stable isotopes with the aim of differentiating their origin. The Austrian project contribution focused on longhorn beetles of the genus *Monochamus*, which function as vectors of the pinewood nematode. Samples from nine European countries were analyzed. The samples showed a variation of stable isotopes from -115 to -45 ‰ for d2H, -27 to -21 ‰ for d13C and -11 to + 6 ‰ for d15N. Samples from higher latitude (i.e., Sweden) showed markedly lower d2H values than samples from lower latitude. Samples from Spain and France varied within ca. 40 ‰-points, representing a wide variety of regions (coastal to mountain forests). Samples from Portugal were more homogenous; they varied within 20 ‰-points. The results show that a partial – with existing overlap – differentiation between countries as well as between regions within countries is possible with stable isotopes. An in-depth statistical analysis of the data will be carried out in the still ongoing Euphresco project when data from all partners are available. Then also a general conclusion on the method will be possible.

Bundesforschungszentrum für Wald

Seckendorff-Gudent-Weg 8

www.bfw.gv.at