Zuwendungsempfänger/ ausführende Stelle:

Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt
Abteilung Waldschutz
Grätzelstr. 2
37079 Göttingen

Förderkennzeichen: 2813HS012
Aktenzeichen: 314-06.01-2813HS012

Thema:

Bekämpfung des Eichenprozessionsspinners (*Thaumetopoea processionea* L.) mit Nematoden mittels hubschraubergestützter Applikation

Laufzeit:
01.04.2014-31.03.2017

Berichtszeitraum:
01.04.2014-31.03.2017

Zusammenarbeit mit anderen Stellen:

- Helix Fluggesellschaft mbH
- e-nema GmbH - Gesellschaft für Biotechnologie und biologischen Pflanzenschutz mbH
- Julius Kühn Institut - Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen Institut für Anwendungstechnik im Pflanzenschutz

Abschlussbericht erstellt durch:
Nordwestdeutsche Forstliche Versuchsanstalt, Abt. Waldschutz

Inhaltsverzeichnis

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens 2
1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens 2
1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde 4
2. Material und Methoden 6
2.1 Labor-Bioassays 6
2.1.1. Wiederkehrende Teile des Versuchsaufbaus 6
2.1.2 Bioassays mit einzelnen Raupen 8
2.1.3 Bioassays mit Raupengruppen 9
2.1.4 Bioassays mit verschiedenen Formulierungen 12
2.2 Semi-Freiland-Bioassays 13
2.3 Prüfungen der Spritzanlagentechnik 15
2.3.1 Düsentests 15
2.3.2 Modifikation der Spritzanlage 16
2.3.3 Prüfung einer Simplex 5100 Spritzanlage 17
2.4 Freilandversuche 18
2.4.1 Allgemeines Versuchsschema der Freilandprüfungen 19
2.4.2 Bonituren zur Wirksamkeit 20
2.4.3 Kontrolle der Ausbringungsqualität 24
2.4.4 Witterung 28
3 Ergebnisse 30
3.1 Ergebnisse der Labor-Bioassays 30
3.1.1 Wirksamkeit von S.f.-Nematoden gegenüber L1-Raupen im Labor 30
3.1.2 Wirksamkeit gegenüber Raupengruppen 31
3.2 Dosis-Wirkungsbeziehung bei L4/L5-Stadien im Semi-Freiland 37
3.3 Ergebnisse technischer Prüfungen 38
3.3.1 Düsentests 38
3.3.2 Prüfergebnis der Spritzanlage 39
3.4 Ergebnisse der Freilandversuche 42
3.4.1 Dichte des EPS-Vorkommens an Probebäumen 42
3.4.2 Qualität der LFZ-Applikationen 47
3.4.3 Witterung 55
3.5 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse 57
4. Zusammenfassung 58
5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen 59
6. Literaturverzeichnis 61

1. Ziele und Aufgabenstellung des Vorhabens

Ziel des Vorhabens war die Entwicklung eines Verfahrens zur Applikation von entomopathogenen Nematoden (*Steinernema feltiae* FILIPJEV) per Luftfahrzeug im Kronenraum von Eichen, um dort blattfressende und gesundheitsschädliche Raupen des Eichenprozessionsspinners (*Thaumetopoea processionea* L.) wirksam zu reduzieren. Die Ausbringung von Nematoden im Wald mittels Hubschrauber sollte praxisreif entwickelt und die Wirksamkeit gegenüber Eichenprozessionsspinnern (EPS) nachgewiesen werden.

1.1 Planung und Ablauf des Vorhabens

Der geplante Zeitablauf des Projektes zwischen Januar 2014 und Dezember 2016 ist in Abb. 1 dargestellt:

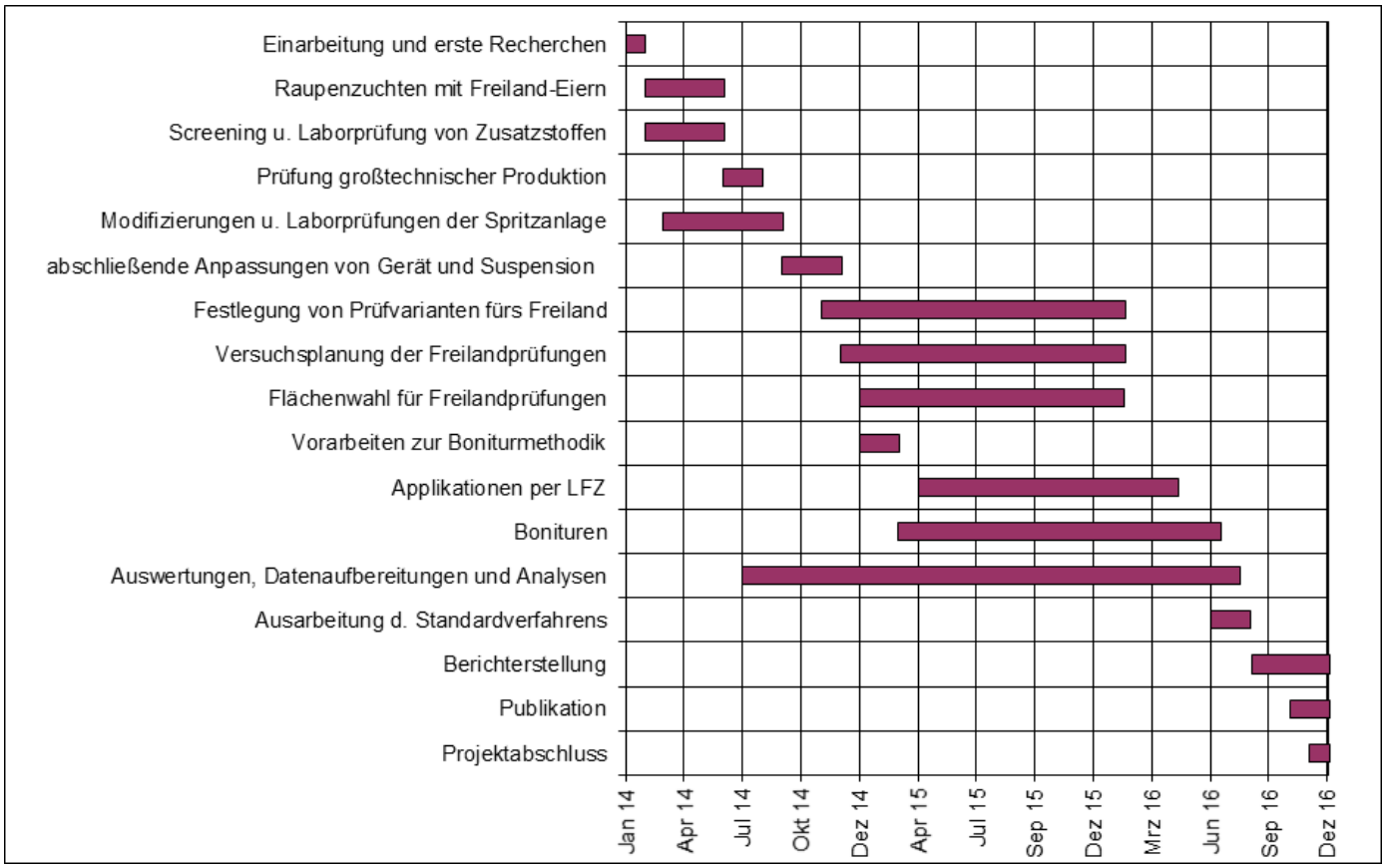


Abb. 1: Ursprünglicher Arbeitsplan für die geplante Projektlaufzeit Januar 2014 bis Dezember 2016

Die ursprüngliche Zeitplanung sah vor, zunächst im Labor die grundsätzliche Wirksamkeit von *S. feltiae* gegen Raupen des Eichenprozessionsspinners aufzuzeigen und der Fragestellung nachzugehen, welche besonderen Eigenschaften von Nematoden bei hubschraubergestützter Applikation im Kronenraum durch Dosierung und Formulierung einer Suspension erfüllt werden müssen. Begleitend sollten simulierte Ausbringungen mit einer Hubschrauber-Spritzanlage im Stand die

erforderlichen technischen Anpassungen (insbesondere Ausbau von Sieben, Prallflächen, Modifikationen bei Pumpendruck und Düsendurchmesser) klären, um *S. feltiae* vital und in geeigneter Verteilung zu applizieren.
Schließlich sollte im Freiland die Ausbringung mit vorausgewählter, geeignet erscheinender Konfiguration der Spritzanlage und Nematodensuspension geprüft und zur Praxisreife optimiert werden.

Die tatsächlichen Projektinhalte folgten der Planung bis auf begründete Anpassungen. Der zeitliche Ablauf der Arbeiten wurde auf Grund des Projektstarts zu Beginn der jährlichen Raupenaktivität (April 2014) allerdings wesentlich umgestellt. Die ursprünglich als Einstieg geplanten Laborversuche zur Wirksamkeit und die Prüfungen der Spritzanlage auf erforderliche Anpassungen erfolgten ab Winter 2014/15. Zuvor wurden Versuchsflächen für Freilandprüfungen festgelegt und Bonituren der örtlichen EPS-Populationen durchgeführt, um Erfolg bei Freilandprüfungen anhand der Populationsdichte vor und nach der Behandlung zu kontrollieren.
Das folgende Diagramm zeigt den tatsächlichen Arbeitsverlauf von April 2014 bis März 2017:

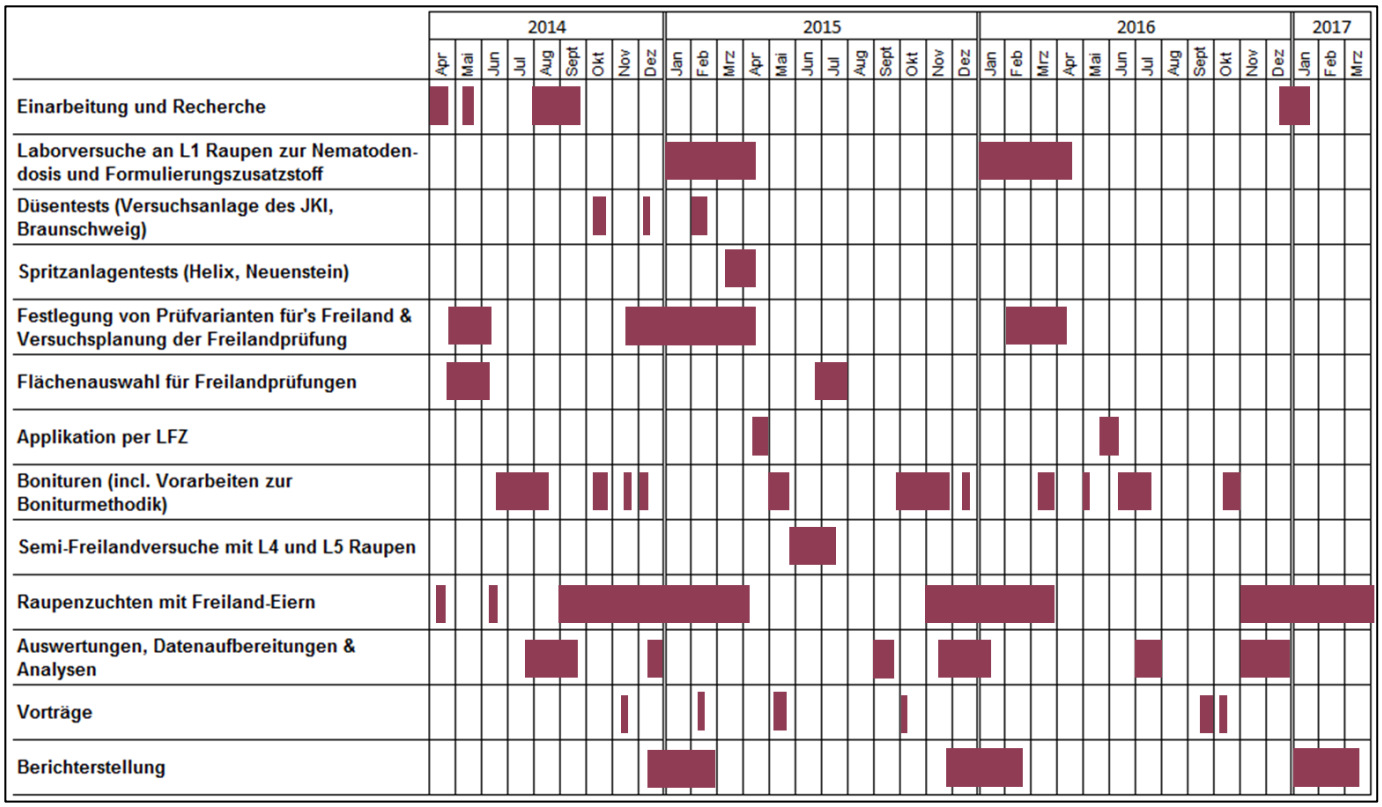


Abb. 2: Tatsächlicher Verlauf des Projekts von Januar 2014 bis März 2017

Die erforderlichen Versuchstiere des EPS für die Labor-Bioassays in den Wintern 2015 und 2016 wurden jeweils im Spätherbst als Eigelege gesammelt und durch Lagerung bei gesteuertem Temperaturregime gestaffelt je nach Bedarf zum Schlupf gebracht. Wirksamkeitsprüfungen an älteren, bereits gesundheitsschädlichen Larvenstadien (L4/L5) des EPS erfolgten als Semi-Freilandversuche im Sommer 2015.

Einflüsse von handelsüblichen Düsen auf die Vitalität applizierter *S. feltiae* und die umsetzbaren Volumenströme wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Anwendungstechnik im Pflanzenschutz des Julius-Kühn-Instituts (JKI-AT) im Projektwinter 2014/15 mit ausgewählten Düsentypen an der dortigen Versuchsanlage untersucht. Vier Düsentypen, die keine Beeinträchtigung von *S. feltiae* erkennen ließen, wurden für nachfolgende Tests an einer Simplex Spritzanlage der Helix Fluggesellschaft verwendet.

Anhand der Ergebnisse aus den Vorversuchen wurden Konzentration der Nematoden, Ausbringungsmenge und Düsentyp für die weitere Prüfung im Freiland festgelegt und ein Versuchsaufbau mit zwei Behandlungsvarianten (flächige Ausbringung, Ausbringung über Einzelbaum) sowie Kontrollen umgesetzt.

Neben drei projektbegleitenden Arbeitsgruppentreffen (21.01.2015, 23.02.2016, 14.12.2016) wurden die Projektinhalte auf verschiedenen öffentlichen Veranstaltungen während der Projektlaufzeit vorgestellt:

- Am 25.-26.11.2014 beim 33. Arbeitskreistreffen des DPG/DGaaE (Deutsche Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie) zum Thema Nutzarthropoden und entomopathogene Nematoden an der Bayerischen Landesanstalt für Weinbau und Gartenbau in Veitshöchheim bei Würzburg.
- Am 19.-20.02.2015 an der University of Hull, England anlässlich einer Expertentagung im Waldschutz (Titel der Konferenz: “Exploring the invasion biology, management and policy for tree insect pests, incorporating the Expert Meeting on Oak Processionary Moth”).
- Am 12. und am 19.05.2015 im Rahmen des Waldschutzseminars Flachland/Bergland der Niedersächsischen Landesforsten in Oerrel und Dassel.
- Am 20.-23.09.2016 auf der 60. Deutschen Pflanzenschutztagung an der Martin-Luther-Universität in Halle-Wittenberg.
- Am 06.10.2015 und am 17.10.2016 zum Erfahrungsaustausch Eichenprozessionsspinnerbekämpfung verschiedener Landkreise, ausgerichtet von der unteren Forstbehörde des Landkreises Stendal.
- Als Poster bei der Forstwissenschaftlichen Tagung vom 26.-29.09.2016 in Freiburg im Breisgau.

1.2 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft wurde

Ein Vorteil entomopathogener Nematoden (EPN) der Gattungen *Steinernematidae* und *Heterorhabditidae* liegt in der Verbindung aus wirtsuchender Nematode mit einem letal insektenpathogenen Bakterium (*Xenorhabdus* bei *Steinernema spec.* u. *Photorhabdus* in *Heterorhabditidae*), das symbiotisch in deren Darm lebt. Nur ein Stadium der meist fünf Stadien umfassenden Nematodenentwicklung, das sogenannte infective juvenile (IJ), trägt die Bakterien. Nach Eindringen eines IJ in eine geeignete Insektenlarve durch deren Mund, Anus oder die Tracheen, möglicherweise auch durch intersegmentale Membranen der Cuticula, entlässt der Nematode seine symbiotischen Bakterien, die dann von der Insektenhaemolymphe leben und sich vermehren. Durch Abgabe eines Toxins töten die Bakterien das Wirtstier. Der Tod tritt normalerweise

innerhalb von 24 bis 48 Stunden ein. Der Nematode ernährt sich währenddessen vom verwesenden Körperinneren der Insektenlarve und auch von den Bakterien, durchläuft vier bis fünf Stadien und vermehrt sich dann. In einem Kadaver können nacheinander mehrere Nematodengenerationen leben (Grewal *et al.* 2005).

Verschiedene entomopathogene Nematoden werden kommerziell produziert und stehen für die Bekämpfung unterschiedlicher, meist bodenbürtiger Schädlinge im Zierpflanzen-, Gemüse-, Obstanbau oder in Baumschulen und im Rasenbereich zur Verfügung. Die Art *Steinernema feltiae* wird insbesondere mittels Gießapplikation gegen bodenlebende Stadien von Trauermücken, wie z.B. *Bradysia coprophila* LINTNER (Jagdale *et al.*, 2004) und Kleiner Kohlfliege, *Delia radicum* L. (Beck *et al.,* 2014; Brusselman *et al.,* 2012; Schroeder *et al.,* 1996) wirksam eingesetzt. Der Einsatz an Blättern oder anderen oberirdischen Pflanzenteilen ist bei Applikation unter Glas bereits etabliert, z.B. gegen Thripse wie *Frankliniella occidentalis* PERGANDE (Belay *et al.*, 2005; Ebssa *et al.*, 2001) und verschiedene minierende Insekten wie z.B. *Liriomyza bryoniae* KALTENBACH (Hara *et al.*, 1993; Williams & Walters, 2000). Auf Grund der Anwendung unter Gewächshausbedingungen wird die Wirksamkeit der Nematoden nicht durch rasche Austrocknung begrenzt. Bei oberirdischer Applikation in Feldversuchen wurden *Steinernema*-Arten mit wechselndem Erfolg eingesetzt. Puppen des Apfelwicklers *Cydia pomonella* L. an Baumrinde wurden dann erfolgreich bekämpft, wenn die Umgebung lange sehr feucht gehalten werden konnte (Kaya *et al.*, 1984; Lacey & Unruh, 1998). Die Verwendung von Nematoden gegen Schaderreger außerhalb des Bodens blieb bisher unerheblich (Arthurs *et al.*, 2004).

Eine Wirkung von *S. feltiae* gegen Raupen des EPS war bis dahin in stichprobenartigen Laborversuchen gezeigt worden (Veitinghoff *et al.*, 2012; Helingman, 2010 (Untersuchung ohne Kontrollen in den Versuchsreihen)). Insbesondere in den Niederlanden setzten Baumpflege-Unternehmen wie z.B. Kuppen Bomenverzorging[1] die Nematodenart auch kommerziell mit Bodenverblasegerät (Sprühkapazität: 300 m³/Min.) nachts an Straßenbäumen gegen EPS ein. Ergebnisse solcher Maßnahmen wurden bisher nicht nachprüfbar ohne unbehandelte Kontrolle dargestellt (Raats, 2010). Das niederländische Ministerium für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz (*Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit*) berichtete über Erfolge der Einsätze (2010-2012) (Fransen & Landschap, 2013) ohne konkrete Zahlen zu nennen.
Zu Projektbeginn war eine Formulierung aus *S. feltiae* und einer Surfactant Polymer Formulierung (SPF) des Herstellers e-nema zum Einsatz gegen Raupen des EPS auf dem Markt (Tp-nema®)[2]. Für Erfolg und Wirkungsgrad sollten laut Produktinformation die Spritztechnik („Raupen sollen voll getroffen werden“) und der Spritzzeitpunkt („abends und nachts“) entscheidend sein. *S. feltiae* aus Zuchten der Fa. e-nema und die SPF, deren Zusammensetzung im Herstellerinteresse hier nicht veröffentlicht wird, wurden regelmäßig bei Versuchen des Projekts eingesetzt.

[1] Kuppen Bomenverzorging, Beerseweg 50, 5451 NR Mill, Niederlande. URL: http://kuppen-bomen.nl/ziekte-plaagbeheer/eikenprocessierups.html, abgerufen am 27.02.2017.
[2] e-nema GmbH, Klausdorfer Str. 28-36, 24223 Schwentinental, mbH. http://www.e-nema.de/professional /oeffentliches-gruen, abgerufen am 03.02.2017.

Die (flächige) Ausbringung von entomopathogenen Nematoden mittels Luftfahrzeug war bis dato nicht dokumentiert.

Allgemeine Empfehlungen für oberirdische Applikationen entomopathogener Nematoden fanden sich bei verschiedenen Autoren. Neben dem artspezifischen Temperaturanspruch - *S. feltiae*-Stämme soll bei geringeren Temperaturen infektiöser sein als *S. carpocapsae* (Lacey *et al.*, 2006) - sei vor allem die rasche Austrocknung ein besonders kritischer Faktor für das Überleben und die Effektivität oberirdischer Applikationen. Die relative Luftfeuchte sollte 80 – 90% oder höher sein (Hara *et al.*, 1993; Williams & MacDonald, 1995; Williams & Walters, 2000) und Lello *et al.* (1996) empfahlen den späten Nachmittag oder Abend für Applikationen. Außerdem sollte der Innendurchmesser von Düsen mindestens so groß sein wie der Durchmesser der zu applizierenden Nematoden (mindestens also 50 µm (Georgis, 1990)) und je größer der Innendurchmesser der Düsen desto besser, empfahlen Fife *et al.* (2007) und Lello *et al.* (1996), die hydraulische Düsen mit Rotationszerstäubern verglichen.

Damit eine Spritzsuspension mit entomopathogenen Nematoden auf wachshaltigen Blattoberflächen (z.B. bei Kohlpflanzen) haften bleibt, soll die Oberflächenspannung der Tropfen reduziert und die Suspension angedickt werden (Wright *et al*., 2005). In den hier vorliegenden Prüfungen wurde dazu SPF mit nach Herstellerangaben entsprechenden Eigenschaften verwendet. Vergleiche verschiedener Formulierungszusatzstoffe hinsichtlich ihrer Wirksamkeit bei Einsätzen gegen *Plutella xylostella* (Applikation auf Kohlblättern) wurden von Schroer *et al*. (2005 a, b, c) und Schroer & Ehlers (2005) veröffentlicht.

2. Material und Methoden

2.1 Labor-Bioassays

Laborversuche zur Wirksamkeit von S.f.-Nematoden und Dosis-Wirkungs-Beziehung wurden in den Räumlichkeiten der NW-FVA aus hygienischen Gründen ausschließlich mit Raupen des ersten Larvenstadiums durchgeführt. Zum einen erfolgten Bioassays, bei denen einzelne EPS individuell behandelt wurden. Das entspricht dem häufig umgesetzten Versuchsaufbau zur Prüfung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen. Zum anderen untersuchten Versuche die Wirkung gegenüber Gruppen von Raupen (hier Verbände von Tieren aus einem Gelege), um damit das soziale Verhalten der Prozessionsspinner mit der Möglichkeit gegenseitiger Infektion zu berücksichtigen.

2.1.1. Wiederkehrende Teile des Versuchsaufbaus

Bei allen Laborversuchen wurden wiederkehrende Versuchsteile, wie die Bereitstellung der Raupen und die Qualitätsprüfung von Nematodensuspension methodisch unverändert durchgeführt.

Als Versuchstiere wurden EPS aus Absammlungen im Freiland verwendet. Für die Versuche im Labor wurden aus hygienischen Gründen ausschließlich Raupen des

ersten, noch nicht mit Brennhaaren ausgestatteten Larvenstadiums eingesetzt. Jeweils ab Herbst wurden dazu im Freiland etwa einhundert Aststücke mit Gelegeplatten mit je ca. 50 bis 200 Eiern gesammelt und anschließend im Kühlraum bei ca. 8°C in transparenten Polypropylen-Bechern (250 ml) gelagert. Ein vorzeitiges Schlüpfen der Raupen konnte zuverlässig bis Ende Februar unterbunden werden. Zugleich war es durch Haltung von Gelegen in einem durchschnittlich 16°C warmen Raum mit Tageslicht möglich, weitgehend bedarfsgerecht den Schlupf von Versuchstieren auszulösen. Bei der Zimmertemperatur schlüpften die Raupen nach etwa 10 (7-14) Tagen. Geschlüpfte Tiere wurden umgehend bei Versuchen eingesetzt und nicht gefüttert, um die Entwicklung gesundheitsschädlicher Stadien zu verhindern. Ohne Fütterung starben die Raupen nach 10-14 Tagen.

Qualitätsprüfungen der Nematodensuspensionen wurden jeweils vor Versuchsbeginn durchgeführt, da die tatsächliche Dichte von Nematoden in Verkaufsgebinden teilweise von den Herstellerangaben abweicht sowie der Vitalitätszustand der Nematoden insbesondere durch Lagerung beeinträchtigt sein kann.
Für die Qualitätsprüfungen wurden stichprobenartig jeweils 20 Tropfen (je 100 µl) einer Verdünnung der für den Versuch vorbereiteten Suspension entnommen (Abb. 3). Unter dem Binokular wurde die Anzahl vitaler und nicht vitaler Nematoden in den Tropfen gezählt und daraus auf die Nematodendichte in Mio. *S. feltiae* pro Liter Spritzsuspension mit der folgenden Formel hochgerechnet:

$$\frac{\sum_{\text{Nematoden}} * vF}{\sum_{\text{Tropfen}} * V_{\text{Tropfen}}} = konz.\left[\frac{Mio.S.f.}{l}\right]$$

$\sum_{\text{Nematoden}}$ = Summe aller gezählten Nematoden in allen Tropfen.
vF = Verdünnungsfaktor
$\sum_{\text{Tropfen}}$ = Summe aller Tropfen. Hier im Beispiel: $\sum_{\text{Tropfen}} = 20$
V_{Tropfen} [µl] = Tropfenvolumen eines einzelnen Tropfens

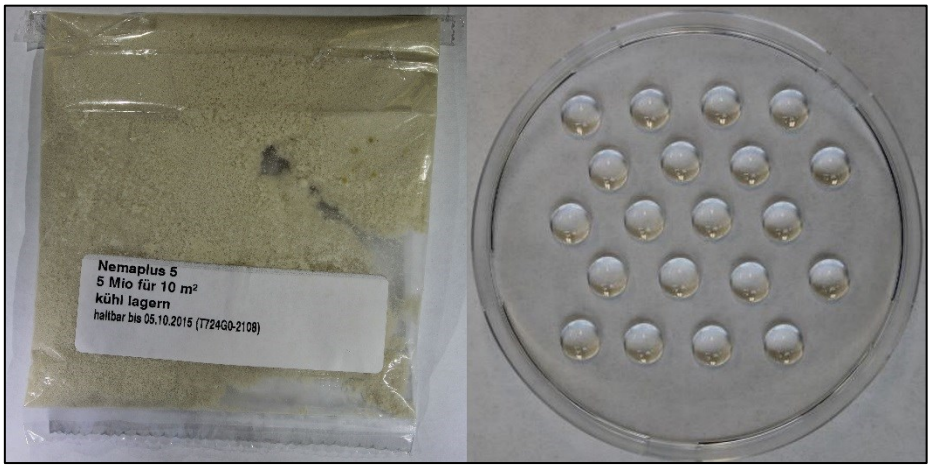


Abb. 3: Links: Typische Packungseinheit mit 5 Mio. Steinernema feltiae in einer Trägersubstanz, vertrieben als „Nemaplus“ oder „Nemaflor“. Rechts: 20 x 100 µl Tropfen zum Auszählen auf einer Petrischale. Jede Tropfenreihe stammt aus einem Reagenzglas.

Die Vitalität wurde anhand der Form oder Bewegung der Nematoden (steif und langgestreckt = nicht vital; vgl. hierzu Bilder von *Heterorhabditis bacteriophora* in Fife *et al*., 2003) beurteilt. Es hat sich gezeigt, dass Dichten bis max. 50 Nematoden je Tropfen zählbar waren. Größere Nematodenmengen in der Ausgangssuspension erfordern eine entsprechende Verdünnung.

Da die Repräsentativität der gezogenen Stichproben regelmäßig von der Homogenität der Suspension abhängt, wurde großer Wert auf die intensive Durchmischung gelegt.

2.1.2 Bioassays mit einzelnen Raupen

EPS (L1) wurden einzeln in den Wells (=Vertiefung) einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit ebenen Well-Böden gehalten (Abb. 4) und hier vorübergehend verschiedenen Suspensionen ausgesetzt.

Abb. 4: Bioassay mit EPS-Raupe (L1) im Plate-Well (mit Steinernema feltiae).

Die Wirksamkeitsprüfungen wurden mit zwei Behandlungsvarianten unterschiedlicher Konzentrationen von S.f.-Nematoden (1 Mio. S.f. / l Wasser bzw. 4 Mio S.f. / l Wasser) vorgenommen. Als Zusatzstoff wurde Surfactant Polymer Formulation (SPF) der Firma e-nema eingesetzt, außerdem enthielten die Prüfmittel eine Lösung der Trägersubstanz des Verkaufsgebindes. Applikationen erfolgten mit 100 µl je Raupe. Die EPS konnten der applizierten Flüssigkeit in den Wells nicht ausweichen (Abb. 4) und waren ihr mit einer Expositionszeit von einer oder vier Stunden ausgesetzt, ehe sie in nicht kontaminierte Behälter umgesetzt wurden. Die Anzahl getesteter Raupen ist in Tab. 1 angegeben. Wegen unterschiedlicher Schlupfzeitpunkte variierte die Zahl der Wiederholungen und der eingesetzten Raupen in den Teilversuchen.

Nach der Applikation wurden die Raupen über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen (außer an Wochenenden) täglich hinsichtlich ihres Vitalitätszustands bonitiert. Dabei

wurde zwischen vitalen, d.h. auf taktilen Reiz reagierenden und toten Raupen unterschieden.

Bezeichnung der Behandlungsvariante:	**Beschreibung:**	**Expositions-zeit:**	**Anzahlen der behandelten Raupen**
Unbehandelte Kontrolle	Die Raupen erfuhren dieselben mechanischen Behandlungen wie Raupen der anderen Versuchsglieder (z. B. Umsetzen), aber keine Applikation.	1 Std.	40
		4 Std.	39
Wasser	Behandlung mit Leitungswasser	1 Std.	34
		4 Std.	34
Gelöster Trägerstoff[3]	Trägerstoff/Granulat, in dem enema Nematoden ausliefert, aus dem Überstand einer Lösung gewonnen.	1 Std.	40
		4 Std.	39
SPF	Zugabe von 1,85 g Surfactant-Polymer-Formulierung des Nematodenherstellers in 1l Wasser	1 Std.	40
		4 Std.	45
1 Mio. S.f./l	1 Mio. *Steinernema feltiae* pro Liter Wasser	1 Std.	-
		4 Std.	12
1 Mio. S.f./l +SPF	1 Mio. *Steinernema feltiae* pro Liter Wasser und SPF	1 Std.	-
		4 Std.	12
4 Mio. S.f./l	4 Mio. *Steinernema feltiae* pro Liter Wasser	1 Std.	14
		4 Std.	42
4 Mio. S.f./l +SPF	4 Mio. *Steinernema feltiae* pro Liter Wasser und SPF	1 Std.	14
		4 Std.	41

Tab. 1: Behandlungsvarianten und Anzahl der Raupen bei Bioassays unter Laborbedingungen.

2.1.3 Bioassays mit Raupengruppen

Gruppen aus je 20 EPS-Raupen wurden in einer Glas-Petrischale[4] oder auf einem Eichenastabschnitt in PP-Bechern (Abb. 5) jeweils mit 1 ml Spritzsuspension behandelt. Die Behandlungsvarianten entsprachen der Wirksamkeitsprüfung an einzelnen Raupen. Sie sind in Tabelle 2 dargestellt. Applikationen erfolgten auf das jeweilige Raupenkollektiv mit einer B20L-Spritzpistole. Alle Behandlungsvarianten wurden mindestens 15fach wiederholt. Schwankungen beim Schlupf der Raupen führten dazu, dass die Zahl der Wiederholungen für einzelne Behandlungsvarianten auf bis zu 19 erhöht werden konnte, aber auch dazu, dass einzelne Gruppen nicht der Sollstärke von 20 Raupen entsprachen (Tab.2).

[3] Um eine Wirkung des Trägerstoffes, in dem die Nematoden geliefert wurden, zu prüfen, wurde das Gemisch aus *S. feltiae* und Trägerstoff getrennt. Dazu ruhte eine Nematodensuspension solange bis die Nematoden sedimentiert waren und überstehender Trägerstoff dekantiert werden konnte.

[4] Petrischalen aus Plastik sind in der Anschaffung kostengünstiger, hatten aber den Nachteil, dass elektrostatische Ladung die leichten L1-Raupen beeinflusste und sie beim Abheben des Deckels aus der Schale herauszog.

Nach Applikation verblieben die Raupen über eine, vier oder acht Stunden in der Petrischale und wurden dann in neue Schalen überführt. Die auf einem Eichenastabschnitt aufgesetzten Raupen verblieben nach der Applikation der Nematoden in den PP-Bechern unter Gaze.

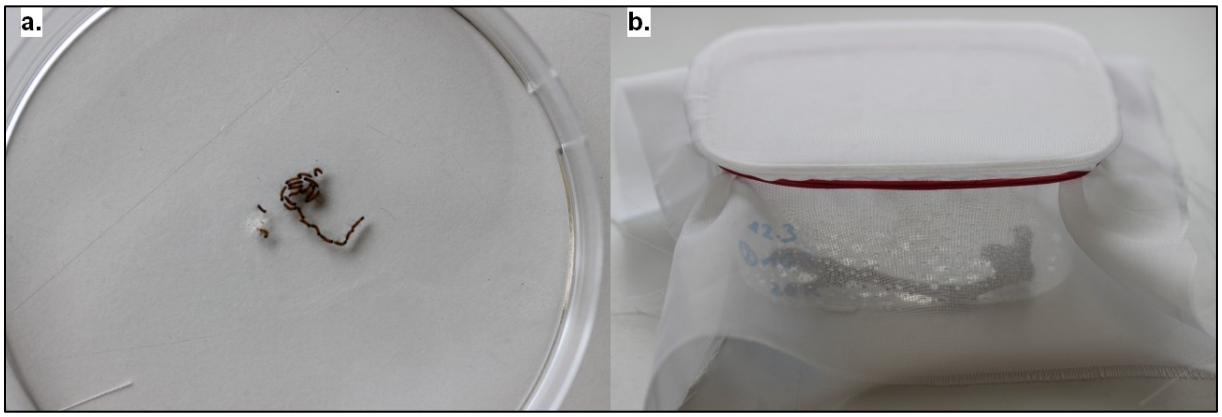


Abb. 5: Raupengruppen a. in einer Petrischale und b. am Ast im PP-Becher mit Gazeverschluss.

Die Vitalität der Raupen wurde täglich über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen bonitiert (außer an Wochenenden). Dabei wurde zwischen vitalen, d.h. auf taktilen Reiz reagierenden und toten Raupen unterschieden.

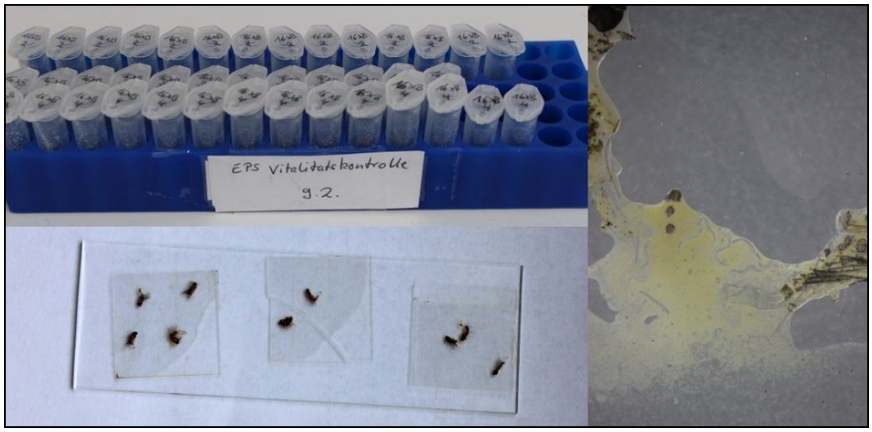


Abb. 6: <u>Links oben:</u> Tote Raupen wurden einzeln in ein Eppendorf Tube mit Wasser überführt und entsprechend dem Todestag in Racks sortiert. <u>Links unten:</u> Objektträger mit 9 Quetschpräparaten . <u>Rechts:</u> Herausgequetschte Hämolymphe mit S. feltiae.

Eine Infektion der abgestorbenen Raupen durch Nematoden wurde in allen Behandlungsvarianten geprüft. Dazu wurde eingedrungenen Nematoden zunächst Zeit zur Vermehrung eingeräumt, da eine zuverlässige Bestätigung nur einzelner Nematoden je Raupenkörper methodisch nicht umsetzbar erschien. Alle abgestorbenen Raupen wurden für eine Woche in Wasser bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Anschließend wurde ein Quetschpräparat jeder Raupe unter dem Binokular auf Nematoden in der Hämolymphe untersucht (Abb. 6). Nach fünf Minuten wurde die Beobachtung der Raupenhämolymphe abgebrochen. Nur für solche

Raupen, bei denen Nematoden mit mehreren Individuen beobachtet wurden, wurde als Todesursache die Infektion mit *S. feltiae* festgestellt.

Im Rahmen der Laborversuche erwiesen sich drei Tage für die Vermehrung der Nematoden als ausreichend.

Bezeichnung der Behandlungs-variante:	**Beschreibung:**	**Ex-position/-dauer:**	**Anzahl der Wieder-holungen**	**Anzahl der Raupen** (regelmäßig 20 Raupen/ Wdh.)
Unbehandelte Kontrolle	Auf diese Raupen wurde Nichts aufgetragen, sie erfuhren aber dieselbe mechanische Behandlung wie die Raupen der anderen Gruppen (z. B. Umsetzen).	1 Std.	6	95
		4 Std.	6	120
		8 Std.	5	115
		auf Ast	2	40
Wasser	Leitungswasser	1 Std.	6	110
		4 Std.	6	119
		8 Std.	4	82
		auf Ast	1	20
Gelöster Trägerstoff[3]	Trägerstoff/Granulat, in dem e-nema Nematoden ausliefert, aus dem Überstand einer Lösung	1 Std.	5	80
		4 Std.	6	110
		8 Std.	3	60
		auf Ast	1	20
SPF	Zugabe von 1,85g Surfactant-Polymer-Formulierung in 1 l Wasser	1 Std.	6	110
		4 Std.	6	120
		8 Std.	4	80
		auf Ast	2	40
1 Mio. S.f./l	1 Mio. *Steinernema feltiae* pro Liter Wasser	1 Std.	6	110
		4 Std.	5	100
		8 Std.	4	80
		auf Ast	4	80
1 Mio. S.f./l +SPF	1 Mio. *Steinernema feltiae* pro Liter Wasser und 1,85g Surfactant-Polymer-Formulierung	1 Std.	5	90
		4 Std.	6	129
		8 Std.	4	81
		auf Ast	4	80
4 Mio. S.f./l	4 Mio. *Steinernema feltiae* pro Liter Wasser	1 Std.	5	90
		4 Std.	7	140
		8 Std.	4	85
		auf Ast	2	40
4 Mio. S.f./l +SPF	4 Mio. *Steinernema feltiae* pro Liter Wasser und 1,85g Surfactant-Polymer-Formulierung	1 Std.	4	70
		4 Std.	7	140
		8 Std.	4	80
		auf Ast	2	40

Tab. 2: Behandlungsvarianten und Wiederholungen der Bioassays an Raupengruppen

2.1.4 Bioassays mit verschiedenen Formulierungen

Um Wirkung von Zusatzstoffen in verschiedenen Formulierungen zu untersuchen, wurden Gruppen von je 20 Raupen in Petrischalen (Abb. 5) mit jeweils einem Hub (1ml) einer Spritzlösung aus einem B20L-Handsprühgerät behandelt. Prüfmittel waren BREAK-THRU® S 240[5] (im Folgenden BreakThru genannt) und NU-FILM®-P[6] (im Folgenden NuFilm genannt). Beide Netzmittel wurden in verschiedenen Konzentrationen sowohl mit gleichbleibend 4 Mio. *S. feltiae* /l Wasser als auch in Spritzlösungen ohne *S. feltiae* eingesetzt, um neben der Kombinationswirkung auch eine gegebenenfalls durch den Zusatzstoff bedingte Mortalität feststellen zu können. Zum Vergleich erfolgte die Behandlung mit der SPF der Firma e-nema, die BreakThru enthält. Die Behandlungsvarianten und die Anzahl der Wiederholungen jeder Behandlungsvariante sind in Tab. 3 dargestellt.

Die für die Versuchsreihe gewählten Konzentrationen der Prüfmittel orientierten sich zum einen an allgemeinen Herstellerempfehlungen und griffen zum anderen positive Erfahrungen der Firma e-nema mit der dort hergestellten und vertriebenen SPF auf.
BreakThru wurde mit folgenden Konzentrationen geprüft: volle (0,01%) Konzentration des Netzmittelanteils im SPF, halbe (150 ml/ha, bezogen auf 300l Spritzmittel/ha entspricht dies 0,05%) und maximale (300 ml/ha, entspricht bei 300l Spritzmittel/ha 0,1%) Herstellerempfehlung für Obst- und Plantagenbäume.
Für NuFilm wurden Konzentrationen geprüft, die der kleinsten Prüfkonzentration für BreakThru entsprach (0,01%) sowie auch hier der halben (0,08 %) und der maximalen (0,16%) Herstellerempfehlung entsprachen.

Allen Behandlungsvarianten wurde 0,1% Xanthan beigegeben, um das Absinken von Nematoden in der Suspension zu verlangsamen (Schroer u. Ehlers, 2003).

Die Raupengruppen wurden nach vier Stunden Expositionszeit aus der Petrischale in eine kontaminationsfreie Petrischale überführt. Vitalitätskontrollen erfolgten an den vier folgenden Tagen.

---

[5] Evonik Degussa GmbH, Rellinghauser Straße 1 -11, 45128 Essen; Genehmigungsnummer der Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Dezember 2015: 4948-00. Laut Herstellerangaben handelt es sich um ein Polyether-modifiziertes Trisiloxan, das als Tensid (=Netzmittel) zur besseren Benetzbarkeit und zur besseren Haftung von Spritzbrühen auf Oberflächen eingesetzt wird.

[6] Miller Chemical & Fertilizer Corper, Radio Road 120 17331 Hanover, Pennsylvania, Vereinigte Staaten von Amerika (USA); Genehmigungsnummer der Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Dezember 2015: 5697-00. Besteht maßgeblich aus α-(ρ-Dodecylphenyl)-Ω-hydroxypoly (oxyethylen) und es handelt sich um mehrfach polymerisiertes Pinienöl (96% Pinolene®). Laut Herstellerangaben verbessert es die Haftung, die Blattbenetzung (Verteilung) und die Regenfestigkeit einer Spritzbrühe, bildet einen klebrigen, elastischen Film, der den Tropfen umschließt und den Inhalt vor UV Licht und Verdunstung schützt. CO_2 und O_2 können die Schicht penetrieren. Des Weiteren verbindet sich der Stoff mit der Wachsschicht der Blätter und dringt mit dem Mischpartner (gemeint sind chem. Pflanzenschutzmittel) in das Blattgewebe ein.

Bezeichnung:	**Beschreibung:**	**Anzahl der Wiederholungen** (je 20 Raupen/Wdh.)
Wasser	Raupen wurden nur mit Wasser behandelt.	7 (1 Wiederholung mit 11 Raupen)
B 0,01%	Wasser mit 0,01% BREAK-THRU, 0,1% Xanthan und 0,7% EtOH	7
B 0,05%	Wasser mit 0,05% BREAK-THRU, 0,1% Xanthan und 0,7% EtOH	7
B 0,1%	Wasser mit 0,1% BREAK-THRU, 0,1% Xanthan und 0,7% EtOH	6
B 0,01% + 4 Mio. S.f./l	4 Mio. *S. feltiae* pro Liter Wasser mit 0,01% BREAK-THRU, 0,1% Xanthan und 0,7% EtOH	7
B: 0,05% + 4 Mio. S.f./l	4 Mio. *S. feltiae* pro Liter Wasser mit 0,05% BREAK-THRU, 0,1% Xanthan und 0,7% EtOH	7
B: 0,1% + 4 Mio. S.f./l	4 Mio. *S. feltiae* pro Liter Wasser mit 0,1% BREAK-THRU, 0,1% Xanthan und 0,7% EtOH	6
N: 0,01%	Wasser mit 0,01% NU-FILM, 0,1% Xanthan und 0,7% EtOH	7
N: 0,08%	Wasser mit 0,08% NU-FILM, 0,1% Xanthan und 0,7% EtOH	7
N: 0,16%	Wasser mit 0,16% NU-FILM, 0,1% Xanthan und 0,7% EtOH	6
N: 0,01% + 4 Mio. S.f./l	4 Mio. *S. feltiae* pro Liter Wasser mit 0,01% NU-FILM, 0,1% Xanthan und 0,7% EtOH	7
N: 0,08% + 4 Mio. S.f./l	4 Mio. *S. feltiae* pro Liter Wasser mit 0,08% NU-FILM, 0,1% Xanthan und 0,7% EtOH	7
N: 0,16% + 4 Mio. S.f./l	4 Mio. *S. feltiae* pro Liter Wasser mit 0,16% NU-FILM, 0,1% Xanthan und 0,7% EtOH	6
SPF	Wasser mit 1,85g SPF pro Liter	6
SPF + 4 Mio. S.f./l	4 Mio. *S. feltiae* pro Liter Wasser mit 1,85g SPF	6

Tab. 3: Behandlungsvarianten und Anzahl der Wiederholungen bei Bioassays zu Formulierungszusatzstoffen.

2.2 Semi-Freiland-Bioassays

Da die EPS Raupen ab der zweiten Häutung Brennhaare und das darin enthaltene, (für Säugetiere) toxische Thaumetopoein bilden (Baker *et al.*, 2009), konnten Versuche mit älteren, möglicherweise weniger anfälligen Larvenstadien nur außerhalb von Räumen und Laboren durchgeführt werden. Die Untersuchungen zur Wirksamkeit von S.f.-Nematoden gegenüber größeren Raupen fanden als Semi-Freiland-Versuche im Gartower Forst (Bernstorff'sche Forstverwaltung) in Niedersachsen statt.

Die Versuchstiere wurden vor Ort aus befallenen Eichen abgesammelt. Unter vertretbarem Sammelaufwand musste die Zahl der hier eingesetzten Raupen hinter denen aus Laborversuchen zurückbleiben. Zu Versuchsbeginn wurde durch Messung

der Kopfkapselbreite nach Dissescu u. Ceianu, (1968 in Schwenke, 1978, S. 400) das Larvenstadium der EPS bestimmt. Alle Raupen waren zum Zeitpunkt der Applikation im vierten Larvenstadium. Einige häuteten sich während der 10-tägigen Versuchsdauer (09.06.-18.06.2015) zu L5.

Die Raupen wurden in Gruppen i.d.R. zu je 20 Tieren in Plastikbehältern unter Gaze gehalten. Die Applikation der Spritzbrühen erfolgte mit einem B20L-Handsprühgerät mit je 1 ml pro Raupengruppe, jeweils gezielt auf die gesamte Gruppe. Die Dosierung entsprach Applikationen bei Freilandprüfungen mit 282l Spritzsuspension je Hektar. Es wurden 4, 8 oder 16 Mio. *S. feltiae* pro Liter Wasser verwendet. Die applizierte Menge (Grundfläche der Versuchsbehälter 17,4 cm x 30,5 cm, ≈531 cm²) entsprach den Freilandapplikationen (Tab. 4). Täglich wurden belaubte Eichentriebe in die Boxen gegeben. Vitalitätskontrollen der Raupen erfolgten täglich über insgesamt 10 Tage (außer am Wochenende).

Bezeichnung der Behandlung:	**Beschreibung:**		**Anzahl der Wiederholungen** (20 Raupen/ Wdh.)**:**
Kontrolle	Diese Raupen wurden nicht behandelt.		6 (1 Wiederholung mit 19 Raupen)
Wasser	Behandlung nur mit Leitungswasser		6 (1 Wiederholung mit 19 Raupen)
SPF	Surfactant-Polymer-Formulierung von e-nema in Leitungswasser (1,85g / l)		6 (1 Wiederholung mit 19 Raupen und 1 mit 21)
4 Mio. S.f./l +SPF	6.000 S.f./ml Wasser + SPF ≙1.130 Mio. S.f./ha	4 Mio. *S. feltiae* pro Liter bei Applikation im Freiland mit 282 l/ha.	6 (1 Wiederholung mit 19 Raupen)
8 Mio. S.f./l +SPF	12.000 S.f./ml Wasser + SPF ≙ 2.259 Mio.S.f./ha	8 Mio. *S. feltiae* pro Liter bei Applikation im Freiland mit 282 l/ha.	6 (1 Wiederholung mit 21 Raupen)
16 Mio. S.f./l +SPF	24.000 S.f./ml Wasser + SPF ≙ 4.520 Mio.S.f./ha	16 Mio. *S. feltiae* pro Liter bei Applikation im Freiland mit 282 l/ha.	6 (1 Wiederholung mit 16 Raupen und 2 mit 18)

Tab. 4: Behandlungsvarianten in Semi-Freiland-Bioassays mit der Anzahl der Wiederholungen. Die Applikationsmengen entsprachen späteren Freiland Applikationen mit 282l/ha Spritzsuspension.

Abb. 7: Vitalitätskontrolle bei EPS im Semi-Freiland

2.3 Prüfungen der Spritzanlagentechnik

2.3.1 Düsentests

Um einen geeigneten Düsentyp zu ermitteln, der *S. feltiae* möglichst schadlos (d.h. weiterhin vital und infektiös) aus einer Spritzanlage austreten lässt, und gleichzeitig eine hohe Durchflussmenge gewährleistet, wurden vorausgewählte Düsen in der Versuchsanlage des Julius-Kühn-Instituts für Applikationstechnik (JKI-AT) in Braunschweig in der Zeit vom 02.-13.02.2015 untersucht.
Die Vorauswahl der Düsen erfolgte auf Grundlage von Ergebnissen von Georgis (1990) und Fife *et al.* (2007), wonach der Innendurchmesser der Düse möglichst groß sein soll und mindestens die Breite von S.f.-Nematoden (50 µm) umfassen muss. Die Auswertung eigener Vorversuche zeigte außerdem, dass Tropfen erst ab 1400 µm Durchmesser die bis zu 900 µm langen *Steinernema feltiae* zuverlässig aufnahmen. Nach Screening technischer Informationen von marktüblichen Düsen (hoher Innendurchmesser und Aufbau ohne Prallflächen oder Wirbelkörper, großes Tropfenspektrum, Ausbringungsmenge von 300l/ha umsetzbar) und Beratung durch das JKI-AT wurden die folgenden Düsentypen untersucht (Tab. 5):

Kürzel:	**Düsenbeschreibung:**
EXA	Dreiloch-Düse Albuz EXA, schwarz
Tip_Cap	Tip Cap 110 -16, lila
Albuz	Albuz APG, weiß
LU	Mehrbereichs- Flachstrahldüse LU 120-08, weiß
FL	Fünflochdüse FL, grau, mit Dosierblende 1,8mm /72
FD	FD 20, schwarz
PRE	Vorauflauf-Flachstrahdüse PRE 130-05
VisiFlo	VisiFlo TP 65 15
SJ3	StreamJet SJ3-Lochdüse SJ3-20-VP, schwarz
SJ7	StreamJet SJ7-Lochdüse SJ7-15-VP, hellgrün
Airmix	Airmix Flat Fan 110-05

Tab. 5: Düsentypen in der Prüfung.

In die Prüfungen wurde eine Kontrolle einbezogen, bei der Spritzsuspension ohne Passage durch eine Düse nach dem Verlassen der Prüfanlage untersucht wurde. Alle Versuchsvarianten wurden zwei Mal wiederholt, jede Behandlungsvariante und Versuchswiederholung mit je 20 Pseudoreplikaten. Die Tests erfolgten mit einer Spritzsuspension, wie sie für die Freilandprüfung 2015 vorgesehen wurde (1 Mio. *S. feltiae* und 1,85g SPF pro Liter Wasser). Für jede Wiederholung wurde eine neue Nematodensuspension angemischt. Bei 2 bar Druck, der dem mittleren Arbeitsbereich einer Simplex 5100 Spritzanlage (1 – ca. 3,3 bar) entspricht, wurde die Suspension durch die Testanlage geleitet. Nach Passage durch die Düse wurden jeweils etwa 100 ml der Suspension aufgefangen.

Abb. 8: Düsentestanlage des Instituts für Anwendungstechnik des Julius Kühn Instituts, Braunschweig.

Der Zustand der Nematoden in der Spritzbrühe wurde einmal vor dem Einfüllen in die Anlage und jeweils nach der Passage der Düsen mit der in Kapitel 2.1 beschriebenen Qualitätsprüfung bestimmt. Neben der Unterscheidung zwischen vitalen und unbeweglichen *S. feltiae* wurde hier auch die Anzahl der Bruchstücke von *S. feltiae* gezählt. Die Anteile [%] vitaler Nematoden wurden nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{N\ (S.f.vital)}{N\ (S.f.vital) + N\ (S.f.nicht\ vital) + \frac{N\ (S.f.Bruch)}{2}} * 100 = Anteil\ (S.f.vital)[\%]$$

N (S.f.vital) = Anzahl vitaler Nematoden

N (S.f.nicht vital) = Anzahl der unbeweglichen Nematoden

N (S.f.Bruch) = Anzahl der Bruchstücke von *S. feltiae*

2.3.2 Modifikation der Spritzanlage

Vor Ausbringungen von Nematoden wurde eine zu Versuchszwecken bereitgestellte Simplex 5100 Spritzanlage mit Mischtank und einfachem Spritzgestänge (68 Düsenplätze) geringfügig modifiziert. Die Oberflächen der im Spritztank verbauten Kreiselpumpe wurden geglättet (Abb. 9).

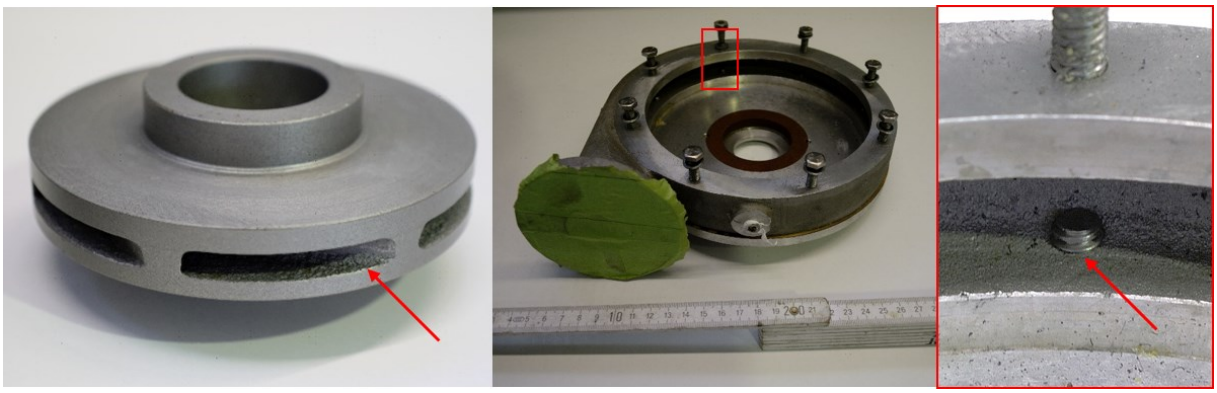


Abb. 9: Pumpenteile der Simplex 5100 Spritzanlage vor der Modifikation. Links: Pumpenrad mit rauer Innenwandung (roter Pfeil). Mitte: Pumpengehäuse mit Befestigungsbolzen und abgeklebtem Druckrohrflansch (grünes Tape). Rechts: Ausschnitt vom mittleren Bild (rotes Rechteck). Bolzen des Pumpengehäuses ragen in den Pumpeninnenraum hinein (roter Pfeil).

2.3.3 Prüfung einer Simplex 5100 Spritzanlage

Um eine geeignete Konfiguration der Spritzanlage zu ermitteln, wurden sowohl Einflüsse einzelner Komponenten (mechanischer Stress, Erwärmung) auf die Vitalität von *S. feltiae* untersucht als auch die tatsächlichen Volumenströme der nach Düsentests vorausgewählten Düsentypen ermittelt. Abschließend wurde die Arbeitsbreite der Spritzanlage für ausgewählte Düsentypen festgestellt.

An Proben aus dem Mischtank (Abb. 10 links und Mitte) und dem Spritztank wurden Qualitätsprüfungen und Temperaturmmessungen vorgenommen. Die Versuche wurden mit 1 Mio. *S. feltiae* und 1,85g SPF pro Liter Wasser durchgeführt. Die Nematodensuspension im Mischtank wurde über eine Dauer von 2:20 Std. umgewälzt und anschließend in den Spritztank gepumpt. Es wurden Proben der Suspension (jeweils 100 ml) für Qualitätsprüfungen entnommen. Die erste Probe wurde 11 Minuten nach Einfüllen aller Suspensionskomponenten in den Mischtank, die zweite nach 36 Minuten und die dritte nach 2:17 Stunden Umwälzung genommen sowie eine weitere Probe aus dem Spritztank.

Bei jeder Probennahme wurde die Temperatur der Spritzsuspension gemessen.

Abb. 10: Links: Mischtank. Mitte: Mechanisches Rührwerk im Mischtank. Rechts: Simplex 5100 Spritztank (abgekoppelt vom Hubschrauber).

Im Anschluss erfolgte das Spritzen mit verschiedenen Testdüsen. Probennahmen erfolgten unmittelbar zu Beginn der Spritzung und nach 5 Minuten sowohl an der Außendüse (1. Düse von außen) als auch an einer mittig liegenden Düse (Düsenplatz 16 von außen) und an einer innenliegenden Düse (Düsenplatz 30 von außen).

Die an der Spritzpumpe anliegende Spannung und Stromstärke sowie die Drehzahl und der Leitungsdruck während der Versuche entsprachen Bedingungen am Hubschrauber im Flugeinsatz.

Zur Volumenstrombestimmung wurde jeweils 5 x 20 Sekunden lang Spritzsuspension an einer innen liegenden Düse, einer mittig liegenden Düse und an einer Außendüse in Messzylindern aufgefangen und das ausgebrachte Volumen gemessen. Der Versuch wurde in zweifacher Wiederholung durchgeführt, einmal nur mit Wasser und einmal mit Nematodensuspension (1 Mio. *S.f*l +SPF).

Die Arbeitsbreite bei Freilandapplikationen wurde für zwei Düsentypen mit den höchsten Volumenströmen (SJ7 und TipCap) mittels 2 m hohem Spritzflug des Hubschraubers über je vier Streifen ausgelegtes, saugfähiges, blaues Papier ermittelt. Auf dem Papier wurde im Anschluss an den Überflug die benässte Breite mittels Maßband ermittelt (Abb. 11).

Abb. 11: Messung der Arbeitsbreite mit ausgewählten Düsentypen SJ7 und TipCap (Hubschrauber des Typs Ecureuil AS 350 mit Simplex 5100 Spritzanlage der Helix Fluggesellschaft mbH).

2.4 Freilandversuche

Unter realen Einsatzbedingungen sollte geklärt werden, ob mit einem vorausgewählten Applikationsverfahren *Steinernema feltiae* bei Luftfahrzeugausbringung wirksam appliziert und Raupen des Eichenprozessionsspinners reduziert werden. Neben technischen Fragen und der Prüfung der Wirksamkeit sollten auch geeignete Rahmenbedingungen für die Ausbringung von Nematoden mit Luftfahrzeug geklärt werden.

Die Auswahl von Versuchsflächen erfolgte nach den Kriterien flächiges Auftreten von EPS, günstige Möglichkeiten für Bonituren (Erreichbarkeit der Baumkronen mit Hebebühne) und hubschraubergestützte Applikation. Geeignete Bedingungen bestanden bei *Vehlgast* (Hansestadt Havelberg, Sachsen-Anhalt) entlang der Havel sowie nahe *Wirl* bei Prezelle (östliches Niedersachsen) in Alteichen, die einem starken Befallsdruck durch EPS ausgesetzt waren. Karten zur Lage der Versuchsflächen und Probebäume für Bonituren befinden sich im Anhang. Die Versuchsflächen in Wirl schieden 2016 aufgrund nur noch sehr geringen Befalls für weitere Prüfungen aus.
Hubschraubergestützte Applikationen von Nematoden erfolgten:

- am 28.04.2015 in Vehlgast und am 29.04.2015 in Wirl gegen L1- bis L2-Stadien
- am 24. und am 25.05.2016 in Vehlgast gegen L3- bis L4-Stadien.

2.4.1 Allgemeines Versuchsschema der Freilandprüfungen

In den Freilandversuchen wurden S.f.-Nematoden mit einem Hubschrauber des Typs Ecureuil AS 350 B2 aus einer Simplex 5100-Spritzanlage mit einfachem Spritzgestänge (ohne Extensions) und 68 Streamjet SJ7-Düsen ausgebracht. Behandlungsvarianten waren in beiden Jahren:

- „Fläche“: Der Hubschrauber überflog zwei Mal die Versuchsfläche, in deren Mitte sich ein Probebaum für Bonituren befand und brachte bei jeder Überfliegung 141l/ha Spritzsuspension aus (Ausbringungsmenge 282l Nematodensuspension /ha). Während 2015 die Versuchsfläche 20 m x 50 m betrug, wurde sie im Folgejahr erweitert auf 20 m x 100 m, um mögliche Effekte bei Starten oder Beenden der Ausbringung zu minimieren.
- „Einzelbaum“: Um sehr hohe Ausbringungsmengen (ähnlich terrestrischen Applikationen mit Blasegerät) als Vergleich für die flächige Behandlung zu erreichen, drehte der Hubschrauber über einem Probebaum eine volle Umdrehung. 2015 vollzog der Hubschrauber die Drehung um die eigene Achse und brachte 25,8 l Suspension pro Baum aus (6 Sekunden Dauer der Drehung und ein Volumenstrom von 4,3 l/Sek), 2016 wurde die Drehung um eine Spitze des Spritzgestänges vollzogen, was den Spritzradius verdoppelte, die Drehungszeit auf bis zu 13 Sek. erhöhte und 55,9 l Suspension pro Baum ausbrachte.
- „Kontrolle“: unbehandelte, vergleichbar befallene Probebäume in den Versuchsgebieten.

Wirkungen jeder Behandlungsvariante auf die Populationsdichte von EPS sowie die Qualität der ausgebrachten Suspension wurden durch folgende Untersuchungen überprüft:

- Zählung der Gespinstnester des EPS je Probebaum (2.4.2.1)
- Zählung von Eigelegen (2.4.2.2)
- Falterfang mit Pheromonfallen (2.4.2.3)
- Mortalitätserfassung bei Raupen nach Applikation (2.4.2.4)
- Qualitätsprüfungen der Spritzsuspension (2.4.3.1)
- Beurteilung der Trocknungsdauer der Suspension (2.4.3.2)
- Erfassung des Spritzbildes (2.4.3.3)
- Virulenz der applizierten *S. feltiae* (2.4.3.4)

Im Laufe der Freilandprüfungen wurden auf Grund der jeweils gewonnenen Erkenntnisse Optimierungen des Verfahrens vorgenommen:

- Wahl des Zielstadiums: 2015 wurden L1- bis L2-Stadien, 2016 L3- bis L4-Stadien behandelt. Durch die Applikation auf die wesentlich größeren Raupen sollten durch mehr direkte Treffer mit applizierten Nematoden vermehrte Infektionen erreicht werden.
- Tageszeit der Applikation: 2015 spät abends, 2016 früh morgens. Die Rahmenbedingungen der Applikation, insbesondere Temperatur und Luftfeuchte während und unmittelbar nach Ausbringung der Nematoden, sollten verbessert werden.
- Konzentration von S. *feltiae* in der Spritzsuspension: 2015: 1 Mio. *S.f.*/l + SPF, 2016: 8 Mio. *S.f.*/l +SPF. Erkenntnisse aus Vorversuchen zu Dosis-Wirkungsbeziehungen wurden in der Freilandprüfung umgesetzt.

2.4.2 Bonituren zur Wirksamkeit

Da Veränderungen der Raupendichte lokaler Populationen nicht unmittelbar zu ermitteln sind, wurden verschiedene Dichteweiser zur Prüfung der Wirksamkeit von hubschraubergestützten Behandlungen mit Nematoden vor und nach Applikation untersucht.

2.4.2.1 Zählung von Gespinstnestern

Die Zahl der Gespinstnester des EPS je Baum diente als eine Kennzahl für die Wirksamkeit von Behandlungen gegen die Raupen. Für wiederkehrend dieselben Probebäume wurde die Nesteranzahl vor und nach der Behandlung ermittelt:

- am 25.06. -10.07.2014 (Ausgangsdichten)
- am 10.06.-25.06.2015 (nach Applikation 2015 und vor Applikation 2016)
- am 29.06.-12.07.2016 (nach Behandlung 2016)

2014 wurden die Nester sowohl vom Boden aus mit dem Fernglas als auch aufwändig durch das Anfahren mit einer Hebebühne und das genaue Absuchen aller Kronenbereiche gezählt. Da das Ergebnis beider Methoden proportional war, wurde in den Folgejahren ausschließlich die einfachere Methode vom Boden aus eingesetzt.

Bei der Zählung wurde unterschieden zwischen kleinen bis faustgroßen Nestern (< 10 cm im Durchmesser), mittelgroßen (10 bis 25 cm Durchmesser) Nestern und großen Nestern (> 25 cm).

2.4.2.2 Zählung der Eigelege

Veränderungen der Gelegezahl vor und nach einer Behandlung wurden durch Zählung an ausgewählten, markierten Ästen der Probebäume erfasst. Die Größe der Gelegeplatten wurde vermessen. Je Probebaum wurden bis zu 30 periphere Äste aus der Lichtkrone mit einer Hebebühne angefahren und je Ast ein etwa 1m langer Suchbereich dauerhaft markiert; dort wurden alle diesjährigen Gelege gezählt:

- im Okt./November 2014 (Ausgangsbestände)
- im Nov. 2015 sowie im Feb. 2016 (nach Applikation 2015 und vor Applikation 2016)
- im Okt./Nov 2016 (nach Applikation 2016).

Die Astbereiche für Zählungen wurden so ausgewählt, dass die Größe der Suchbereiche vergleichbar war (Abb. 12, links). Die Gesamtlänge des abzusuchenden Bereiches betrug etwa 1 m. Die Grenze des Suchbereiches wurde mit einem farbigen Kabelbinder markiert (Abb. 12, links, gestrichelte Linien).

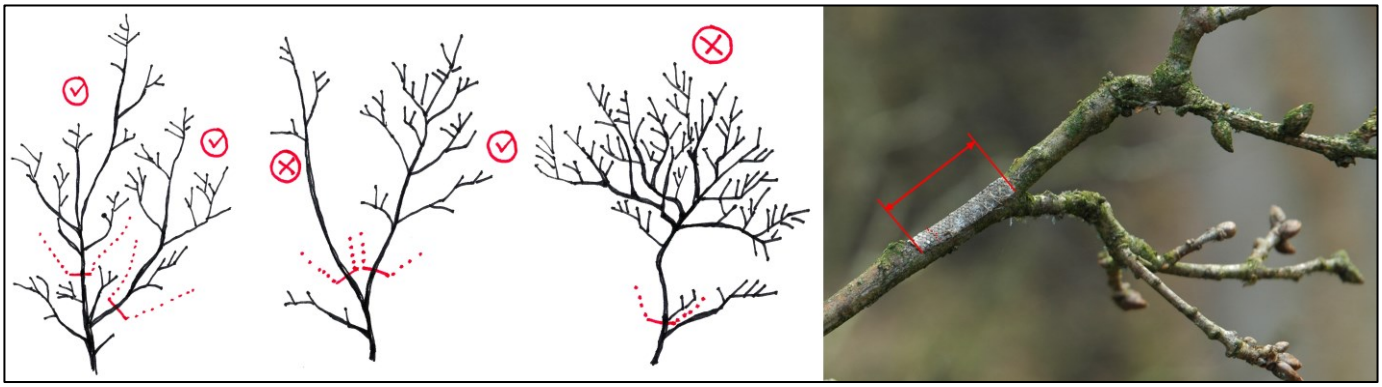


Abb. 12: Links: Schematische Darstellung der Astauswahl: Mit x gekennzeichnete Äste wurden nicht verwendet. Rechts: „diesjähriges" Eigelege

2.4.2.3 Falterfang mit Lockstofffallen

Um die Abundanz von Faltern des EPS auf den Versuchsflächen zu ermitteln, wurden im Projektjahr 2014 Variotrap-Trichterfallen[7] mit einem Lockstoff der Firma Attract[8] eingesetzt. 45 Probebäume wurden jeweils auf ihrer Lichtseite mit zwei Fallen bestückt (90 Variotraps). Eine Falle wurde auf 2 m Höhe am Stamm befestigt. Die zweite Falle wurde mittels Umlenkrolle und Seil auf Höhe der halben Kronenlänge in deren Peripherie gezogen (Abb. 13).
Die Zählung der gefangenen Falter erfolgte wöchentlich während einer vierwöchigen Periode mit Falterflug (30.07.-20.08.2014). Über den gesamten Boniturzeitraum wurden mit 90 Pheromonfallen insgesamt 79 Falter gefangen.

Die chemische Analyse[9] des eingesetzten Lockstoffes zeigte (*Z,Z*)-11,13-Hexadecadienyl Acetat als Bestandteil auf, aber nicht das (*Z,E*)-11,13,15-Hexadecatrienyl Acetat, das Gries *et al.* (2004) als synergistisches Pheromon identifiziert hatten. Da nicht sichergestellt werden konnte, dass die auf dem Markt

[7] Bezogen von Flügel GmbH, Eisdorfer Str. 21, 37520 Osterode am Harz
[8] Bezogen über PROTECTA SAS, 10 ZAC St. Louis, 84250 Le Thor, Vaucluse (84) - Frankreich
[9] Lösungsmittelextraktion mittels Gaschromatographie-Massenspektrometriekopplung im Massenscanbereich 35-450 amu und der Abgleich der Massenspektren mit der NIST-Massenspektrenbibliothek bei Rainer Hartmann, Gesellschaft für angewandte Biologie und Geologie mbH, August-Spindler-Straße 1, 37079 Göttingen.

angebotenen Lockstoffe eine gleichbleibende Produktzusammensetzung besitzen und wirksam sind, war die Vergleichbarkeit von Ergebnissen nicht gewährleistet.
Die durchgeführten Falterfänge wurden daher nicht weitergehend ausgewertet. Die Methode wurde nicht weiter eingesetzt.

Abb. 13: Versuchsaufbau und Komponenten der EPS-Pheromonfallen. Links: Probebaum W11 (Standort Wirl) mit Fallenpositionen (rote Pfeile). Rechts oben: Befestigung der Umlenkrolle am Ast mittels PVC-beschichtetem Lochband und Variotrap-Falle. Rechts unten: Lockstoff-Verpackungseinheiten der Firma Attract.

2.4.2.4 Mortalität von EPS unmittelbar nach Applikation

Nach den Applikationen im Freiland wurden Raupenverbände aus der Kronenperipherie von ausgewählten Bäumen entnommen und die Vitalität der abgesammelten Raupen an den Folgetagen beobachtet. 2016 wurden außerdem abgestorbene Raupen seziert, um die Infektion durch S.f.-Nematoden als Todesursache zu klären.

Das Absammeln von EPS erfolgte nach einer Trocknungs- bzw. Inkubationszeit. Applizierte Nematoden hatten ausreichend Zeit, in Raupen einzudringen (2015 nach der spätabendlicher Applikation Absammeln am folgenden Vormittag, 2016 nach frühmorgendlicher Behandlung beginnend 4 Stunden nach der Applikation). Für die Entnahmen wurden Bäume ausgewählt, die nicht für andere Bonituren vorgesehen waren (keine Probebäume), so dass Beeinträchtigungen der Bonituren

ausgeschlossen waren. Um verschiedene Expositionen der Raupen gegenüber der S.f.-Suspension einzubeziehen, wurden aus unterschiedlichen Bereichen der Eichenkronen (Oberkrone, mittlerer Kronenbereich und unterer Kronenbereich) Raupengruppen entnommen. Das L3- oder L4-Stadium (2016: 448 - 851 Raupen pro Baum) wurden in größerer Zahl gesammelt als L1- bis L2-Raupen (2015: 35-453 Raupen pro Baum).Tabelle 10 stellt die Zahl der untersuchten Raupen bei den verschiedenen Versuchsgliedern dar.
Jede Raupengruppe wurde in einer Petrischalen und/oder Plastikboxen mit Gazeverschluss gehalten und täglich mit frischem Eichenlaub gefüttert (Abb. 14). Abgestorbene Raupen wurden bei täglichen Kontrollen entnommen und gezählt. Der Versuch, die abgestorbenen EPS 2015 bis zur Sezierung in Alkohol zu konservieren, führte dazu, dass die Raupen dunkler und fester wurden und die Nematoden im Inneren starben und unbeweglich wurden. Für Freilandprüfungen 2015 konnte in keinem Fall eine Nematodenvermehrung nachgewiesen werden (Tab.10). Erst nachdem ein Nachweisverfahren für Nematodeninfektionen entwickelt war (Kapitel 2.1.2.1), wurden tote Raupen im Freilandversuch 2016 für drei Tage in Wasser aufbewahrt und die Vermehrung der Nematoden konnte zur Erkennung von Infektionen genutzt werden. Alle toten Raupen wurden nach Ablauf von mindestens 3 Tagen seziert, wobei die größeren L3- oder L4-Raupen statt Herstellung eines Quetschpräparates mit einer Mikroschere aufgeschlitzt wurden. Bei den Beobachtungen der Hämolymphe wurde zwischen keinen, einer oder vielen *S. feltiae* unterschieden (Abb. 15).

Abb. 14: Vorgehen bei der täglichen Vitalitätsbonitur nach Freilandapplikation: Links: Raupen eines Baumes wurden komplett auf die Verschlussgaze entleert. Beim Überführen der Raupen zurück in die Box konnte individuell festgestellt werden, ob sie noch vital waren oder nicht. Rechts: Sobald alle Raupen wieder zurück in ihrer Box waren, wurde frisches Eichenlaub hinzugegeben.

Abb. 15: Sezieren von L3/L4-Raupen 2016 unter Freilandbedingungen

2.4.3 Kontrolle der Ausbringungsqualität

2.4.3.1 Nematodendosis

Um die Menge der ausgebrachten *S. feltiae* pro Flächeneinheit bei den hubschraubergestützten Applikationen zu bestimmen, wurden im Bestand Teile der Spritzsuspension mit Petrischalen (d=14 cm, A=153,94 cm²) aufgefangen (Abb. 16). Aus den Auffangmengen wurden die tatsächliche Ausbringungsmenge und mittels Verdünnungsreihen die Anzahl der Nematoden ermittelt.

In jeder Behandlungsvariante (Fläche oder Einzelbaum) waren an jeweils einem Baum 24 Petrischalen aufgestellt, von denen 12 Petrischalen in der Krone und weitere 12 auf dem Boden außerhalb des Kronenschirms aufgestellt waren (Abb.16 links, grüne Kreuze). Die Montage der Petrischalen auf Holzkreuzen[10] (Abb.16, rechts) schützte gegen das Verwehen der Schalen bei Überflug des Helikopters.

[10] Holzkreuze für Petrischalen aus zwei Brettern mit den Maßen 18 x 1,8 x 110 cm

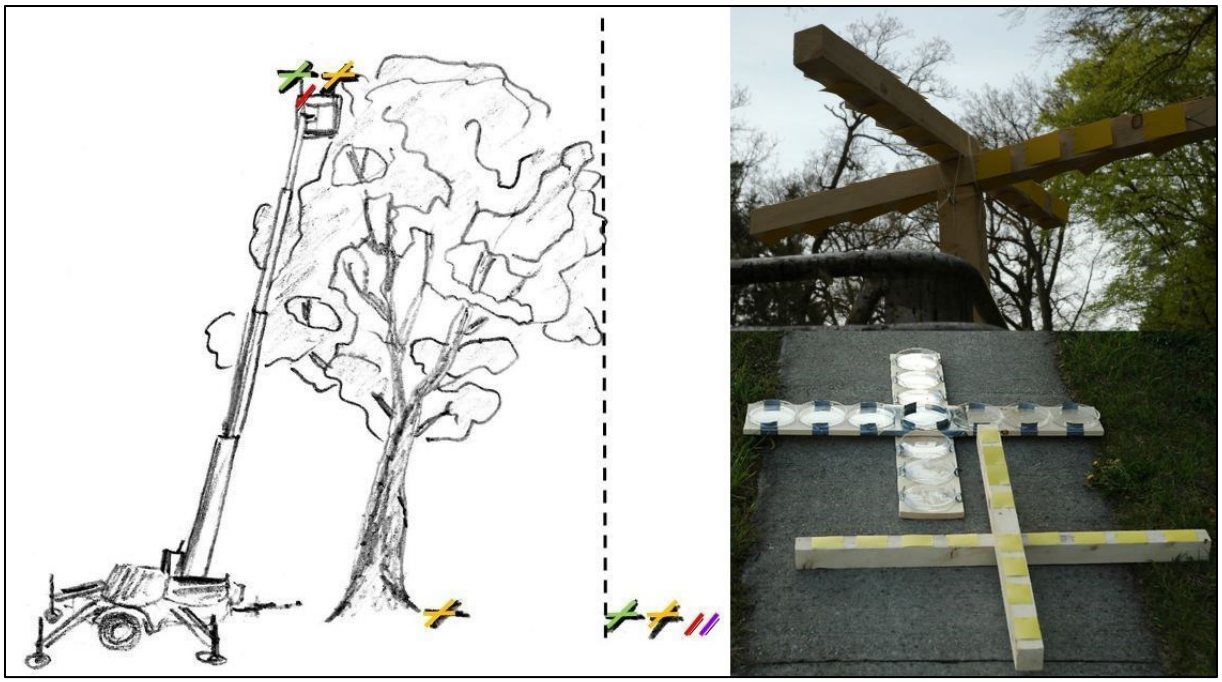


Abb. 16: Versuchsaufbau zur Kontrolle der Ausbringungsqualität. Links: Schematische Darstellung der Lage der verschiedenen Probennahmepunkte relativ zum Baum. Grün: Holzkreuze mit Petrischalen zum Auffangen der Spritzsuspension. Gelb: Holzkreuze mit wassersensitiven Papierstreifen zur Aufnahme des Spritzteppichs. Rot: Schalen mit Wachsmotten zur Ermittlung der Virulenz von S. feltiae. Lila: Schalen mit EPS Raupen zur Ermittlung der Virulenz von S. feltiae. Rechts oben: Holzkreuz mit wassersensitivem Papier an allen Seiten, befestigt am Hebebühnenkorb (Variante aus 2015). Rechts unten: Holzkreuz mit Petrischalen und Holzkreuz mit wassersensitivem Papier (nur oben angebrachte Papierstreifen) für Probennahme nicht überschirmt am Boden.

Die Volumenbestimmungen ausgebrachter Suspension und das Zählen von Nematoden in der Suspension erfolgten unmittelbar nach der Applikation in einem nahen Feldlabor. Jede Petrischale wurde dazu mit einem definierten Wasservolumen in ein Transportgefäß umgefüllt. Die verdünnten Inhalte der Petrischalen wurde anschließend gewogen und aus den ermittelten Massen die Ausbringungsmenge je ha errechnet. Außerdem wurden die Nematodenzahl für jede Petrischale aus fünf Tropfen zu je 200 µl unter Binokular gezählt, wobei zwischen vitalen und nicht vitalen *S. feltiae* unterschieden wurde. Die Methode konnte erst 2016 durch geeignete Verdünnung so umgesetzt werden, dass eine zuverlässige Zählung der Nematoden pro Tropfen möglich wurde. Für Proben aus der Einzelbaumbehandlung wurde die Verdünnung 2016 mit 50 ml, für Proben der flächigen Behandlung mit 30 ml vorgenommen.

2.4.3.2 Verdunstung der ausgebrachten Suspension

Da die Vitalität, Beweglichkeit und Wirksamkeit von Nematoden durch ihren Feuchtigkeitsbedarf begrenzt wird (Shapiro-Ilan *et al.*, 2002), sollte Austrocknung ausgebrachter Nematoden über mindestens drei Stunden verhindert werden (mdl. Mitteilung Ehlers, e-nema). Zur Feststellung der Verdunstungsdauer unter den gegebenen Bedingungen (Temperatur, Taupunkt u.a.) der Versuchsflächen wurde ausgebrachte Suspension in einer Petrischale am Waldboden aufgefangen und nach der Applikation in kurzen Zeitabständen (ca. 10 min) vor Ort fotografiert (Abb. 17). Die

Veränderung der Tropfengrößen und der Zeitpunkt weitgehender Verdunstung konnten so nachvollziehbar dokumentiert werden. Bei den Bildaufnahmen wurden zusätzlich die Flächenverluste von Tropfen [%] geschätzt.

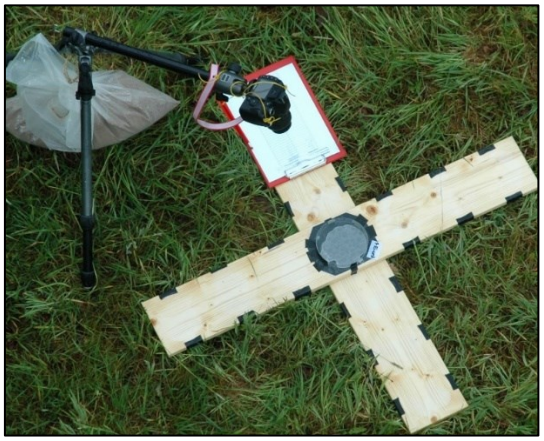


Abb. 17: Versuchsaufbau zur Ermittlung der Verdunstung der Tropfen.

2.4.3.3 Tropfengrößen und Benetzungsanteil

Zur Ermittlung von Tropfengrößen und Benetzungsanteilen wurde wassersensitives Papier (52 x 76 mm, Syngenta[11]) zur Dokumentation des Spritzbildes bei allen Freilandapplikationen eingesetzt (Abb. 18). Bei jeder Behandlungsvariante waren an einem Baum drei Holzkreuze mit Papierstreifen während der Befliegung angebracht. Je ein Holzkreuz befand sich in der Krone, auf dem Boden außerhalb der Schirmfläche und auf dem Boden unter dem Kronenschirm (Abb.16, gelbe Kreuze). 2015 wurden an den Holzkreuzen, die auf Kronenhöhe platziert wurden, an allen Seiten insgesamt 45 wassersensitive Papierstreifen angebracht (Abb. 18). Bei anderen Kreuzen auf dem Boden und im späteren Freilandversuch (2016) wurden ausschließlich oberseits 15 Papierstreifen angebracht, aber keine Papierstreifen mit Ausrichtung zur Seite oder nach unten.
Die Kreuze wurden in der flächigen Behandlungsvariante so ausgerichtet, dass eine Kreuzachse in Flugrichtung und die andere senkrecht dazu verlief.

Zur Auswertung wurden die trocken gelagerten Papierstreifen zusammen mit einer Skala, die als Referenz für die Flächenermittlung diente, gescannt und die Scans mit Hilfe des Programmes ImageJ (Abràmoff *et al.*, 2004) ausgewertet, wobei jedes Tropfenbild nummeriert und seine Flächengröße ermittelt wurde.

[11] Beschafft über agrotop GmbH, Köferinger Straße 5, 93083 Obertraubling.

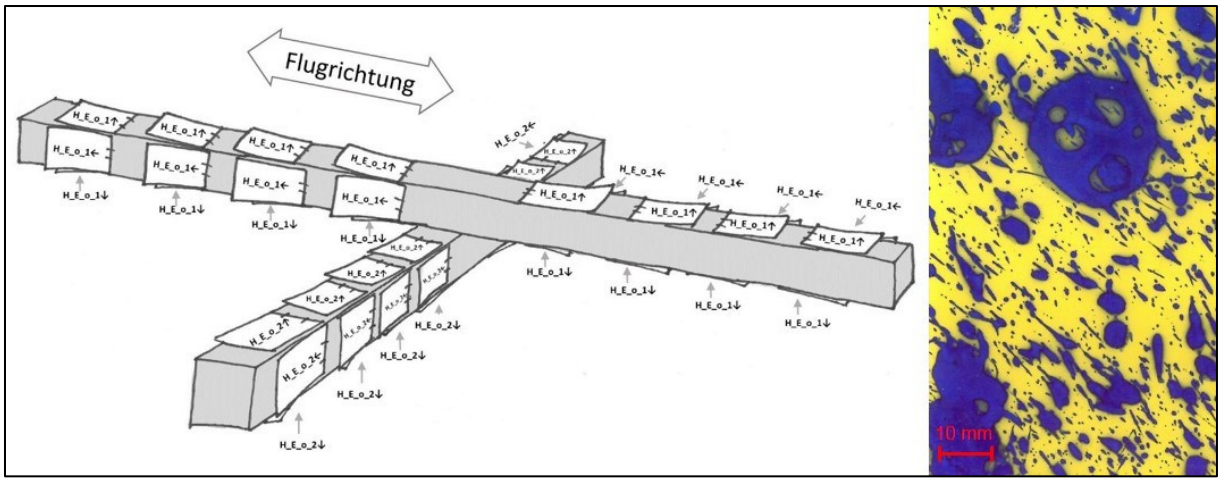


Abb. 18: Links: Schematische Darstellung eines Holzkreuzes mit wassersensitivem Papier an allen Seiten für die Probennahmen auf Kronenhöhe (Variante aus 2015). Rechts: Mit der Spritzbrühe benetzter Papierstreifen aus der flächigen Behandlung 2015, inklusive Skalierung.

2.4.3.4 Virulenz ausgebrachter *Steinernema feltiae*

Bei der Applikation im Freiland 2016 wurde die Virulenz ausgebrachter Nematoden an Wachsmottenlarven und EPS (L3/L4) untersucht. Die Tests sollten klären, ob *S. feltiae* nach Passage der Spritzanlage und dem freien Fall in der Applikation weiter wirksam waren.

Larven der Großen Wachsmotte (*Galleria mellonella*), die u.a. zur Zucht von entomopathogenen Nematoden (Batalla-Carrera *et al*., 2013 und Belay *et al*., 2005) eingesetzt werden, zeigten in Laborversuchen rasche Infektion und hohe Mortaltität, wenn sie auf ein mit *S. feltiae*-Spritzsuspension behandeltes Bodensubstrat platziert wurden.

Für Virulenztests im Freiland wurden in verschließbare Plastik-Schalen (d = 13,5 cm) entweder je 12 Wachsmottenlarven[12] auf ca. 2 cm angefeuchtetem Sand (Feuchtigkeitsgehalt ca. 10%) gegeben oder je 12 EPS. Zu jeder Behandlungsvariante (Fläche, Einzelbaum, Kontrolle) wurden während der Applikation je vier Schalen mit Wachsmottenlarven am Boden und in Kronenhöhe (Abb. 16, rote Striche) aufgestellt und vier Schalen mit EPS am Boden platziert.

Nach der Applikation wurde die Vitalität der Wachsmottenlarven (verfärben sich bei Tod von weiß nach braun/schwarz, Abb. 20) und der EPS an den folgenden 7 Tagen täglich bonitiert. Die EPS wurden in dieser Zeit mit frischem Eichenlaub gefüttert. Alle toten EPS wurden zur Feststellung von Nematodenbefall seziert (Vorgehen wie in 2.4.2.4).

[12] Beschafft im Angelbedarf: Der Schwarzangler, Steinweg 21A, 37077 Göttingen.

Abb. 19: Versuchsdurchführung der Virulenztests während der Applikation im Freiland 2016. Links: Schalen mit Wachsmotten am Hebebühnenkorb. Mitte: Schalen mit Wachsmottenlarven und EPS Raupen in randomisierter Anordnung zueinander am Boden. Rechts: Die EPS Raupen wurden unmittelbar nach der Applikation im Freiland mit Eichenlaub gefüttert.

Abb. 20: Vitalität von Larven der Großen Wachsmotte Galleria mellonella: 3 lebendige Larven (weiß) und 5 tote Larven (braun/schwarz).

2.4.4 Witterung

Da *S. feltie* als Bodenlebewesen an hohe Bodenluftfeuchte angepasst ist, gilt eine Umgebung desto günstiger je höher die relative Luftfeuchtigkeit ist (Arthurs *et al.*, 2004; Navaneethan *et al.*, 2010). Außerdem zeigten Chen *et al.* (2003), dass *S. feltiae* mehr als doppelt so mobil ist bei 15°C Umgebungstemperatur gegenüber 10°C Umgebungstemperatur. Immerhin konnte für diese Nematodenart bei 10 °C überhaupt Aktivität verzeichnet werden. Je weniger mobil *S. feltiae* ist, desto schwieriger sind die Wirtsfindung und Infektion des Wirtes.

In den Versuchsgebieten wurden vor, während und nach jeder Applikation Temperatur und Luftfeuchte mittels Voltcraft[13]-Datenloggern sowie Temperatur, Luftfeuchte, Wind-Parameter und Niederschlag mit einer Davis-Wetterstation[14] dokumentiert. Für Plausibilitätsprüfungen wurden Daten der umliegenden Wetterstationen des Deutschen Wetterdienstes (DWD-Stationen: Gardelegen, Seehausen, Lenzen an d. Elbe, Kyritz, Lüchow) herangezogen.

[13] DL-121TH-Temperatur-Feuchte-Datenlogger-Messschreiber-32-000-40-bis-70-C-01-C: Conrad Electronic AG, Roosstraße 53, 8832 Wollerau, Schweiz

[14] Vantage Pro: Davis Instruments, 3465 Diablo Av., Hayward, CA 94545-2778 U.S.A.

3 Ergebnisse

Alle Ergebnisse werden rein deskriptiv ohne statistische Absicherung dargestellt. Da die bei den Freilandprüfungen erreichten Wirkungsgrade in keinem Fall in Bereiche kamen, die von einem praxistauglichen Verfahren erwartet werden, wurde auf die weitergehende Absicherung der Ergebnisse verzichtet.

3.1 Ergebnisse der Labor-Bioassays

3.1.1 Wirksamkeit von S.f.-Nematoden gegenüber L1-Raupen im Labor

Bei Prüfung der Wirksamkeit von S.f.-Nematoden gegenüber vereinzelten EPS (L1) setzte ab einem Tag nach Applikation Mortalität ein (Abb. 21). Der weitere Verlauf der Mortalität deutet dabei auf eine Abhängigkeit der Sterblichkeit von der Behandlungsvariante hin, wobei der Tod aller Tiere (inkl. Kontrolle) nach spätestens 14 Tagen auf die Haltung ohne Fütterung zurückzuführen war.
Zur Beurteilung der Wirkung der Nematoden wird die Mortalität nur für die ersten vier Tage nach Applikation berücksichtigt. Innerhalb des viertägigen Zeitraums wiesen die Raupen der Kontrollen nur geringe, Raupen in den Behandlungsvarianten mit S.f. eine erhöhte Mortalität auf. Die Mortalität in Behandlungsvarianten mit Nematoden lag höher als in Behandlungsvarianten mit Wasser oder gelöstem Trägerstoff. Im Vergleich der Formulierungen mit Nematoden führte die höhere Nematodendosis von 4 Mio. gegenüber 1 Mio. Nematoden je Liter Wasser im Labor zu einer um etwa 20 Prozentpunkte höheren Mortalität. Die Zugabe von SPF ließ die Mortalitätsrate von L1-Raupen bei gleicher Nematodendosis rascher ansteigen und führte ohne Nematodenbeigabe zu gesteigerter Sterblichkeit gegenüber der Kontrolle.
Es bestand unter Laborbedingungen eine Wirksamkeit von S.f. gegen L1 des EPS. Bei unterschiedlichen Dosierungen der Nematoden konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung nur dem Trend nach vermutet werden.

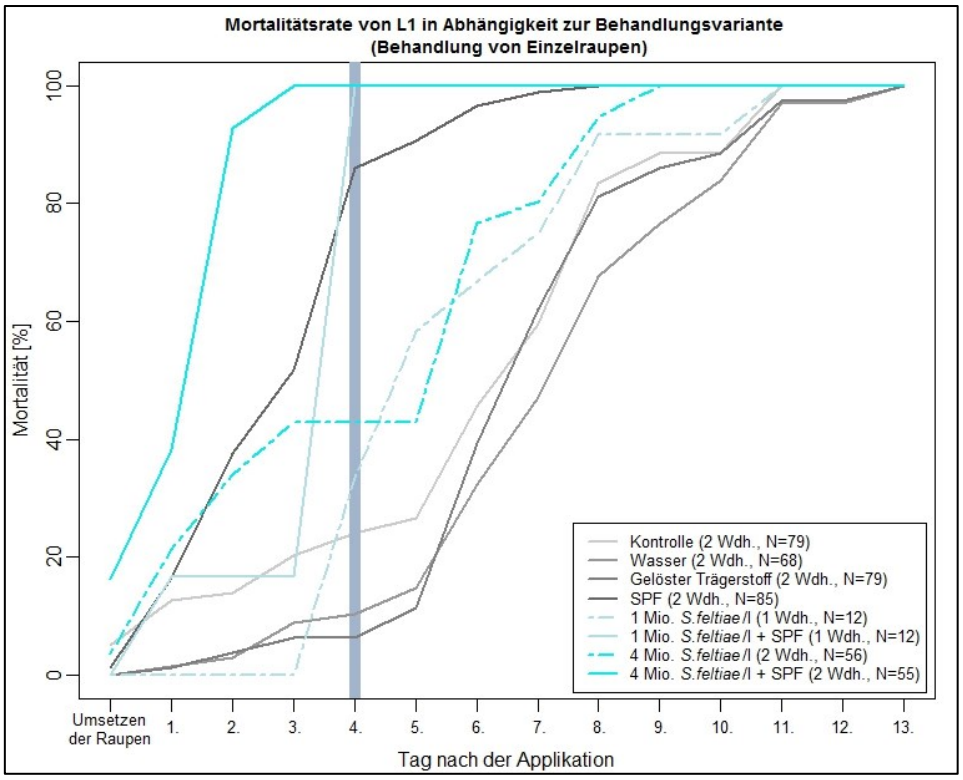


Abb. 21: Mortalitätsrate von Einzelraupen (L1) in Labor-Bioassays. Wdh. = Anzahl der Wiederholungen, N= Anzahl der Raupen in allen Wiederholungen. SPF= Surfactant-Polymer-Formulation.

3.1.2 Wirksamkeit gegenüber Raupengruppen

Das natürlich aggregierte Auftreten des EPS wurde durch Wirksamkeitsprüfung an Raupengruppen (L1) berücksichtigt. Wie bei den Prüfungen an isolierten Raupen kam es auch bei diesen Tests zu versuchsbedingtem Sterben (die Raupen wurden während der Versuche nicht gefüttert) und eine Beurteilung der Wirkung von Nematoden wurde nur für die ersten vier Tage nach Applikation durchgeführt.
Vier Tage nach der Applikation war die Mortalität in den Raupengruppen, die mit *S. feltiae* behandelt wurden, höher als in der unbehandelten Kontrolle und höher als bei Behandlungen nur mit Wasser oder mit Wasser und Trägerstoff (Abb. 22). Die an Einzelraupen festgestellte Wirksamkeit von S.f.-Nematoden gegen EPS bestätigte sich auch gegenüber Raupengruppen. Auch bei Applikation auf Raupengruppen führte die höhere Nematodendosis (4 Mio. S.f./l) zu einem größeren Anteil toter Raupen (Abb. 23) als die geringere Nematodendosis (1 Mio. S.f./l).

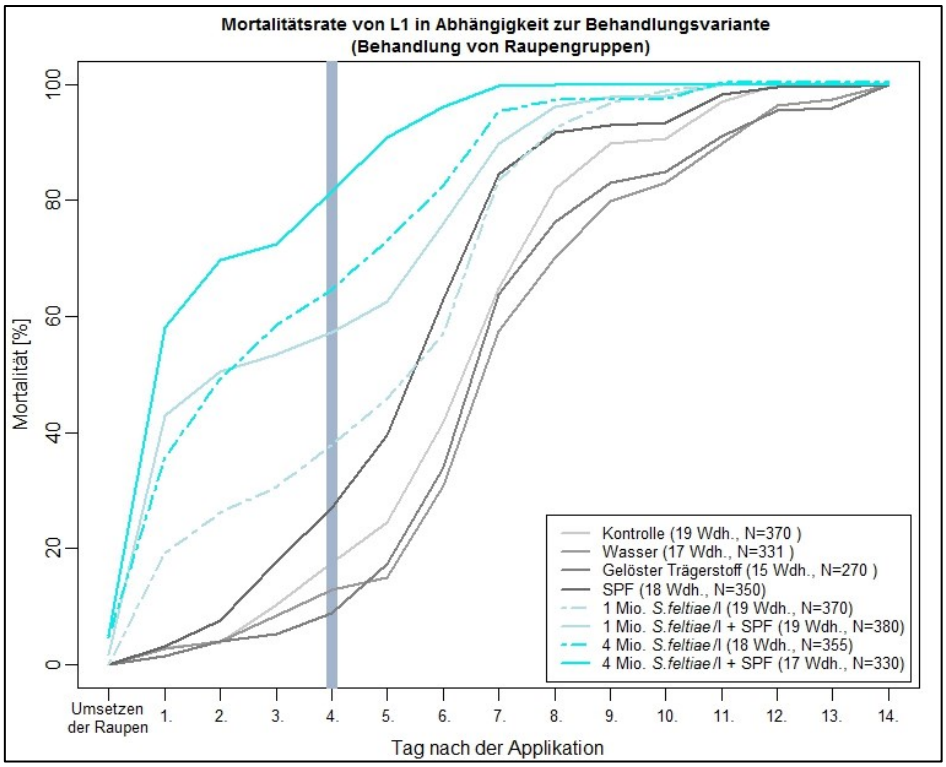


Abb. 22: Mortalitätsrate für Raupengruppen des EPS (L1) in Labor-Bioassays:. Jede Behandlungsvariante in mindestens 15 Wiederholungen (Wdh.) zu je ≈20 Raupen. SPF= Surfactant Polymer Formulation.

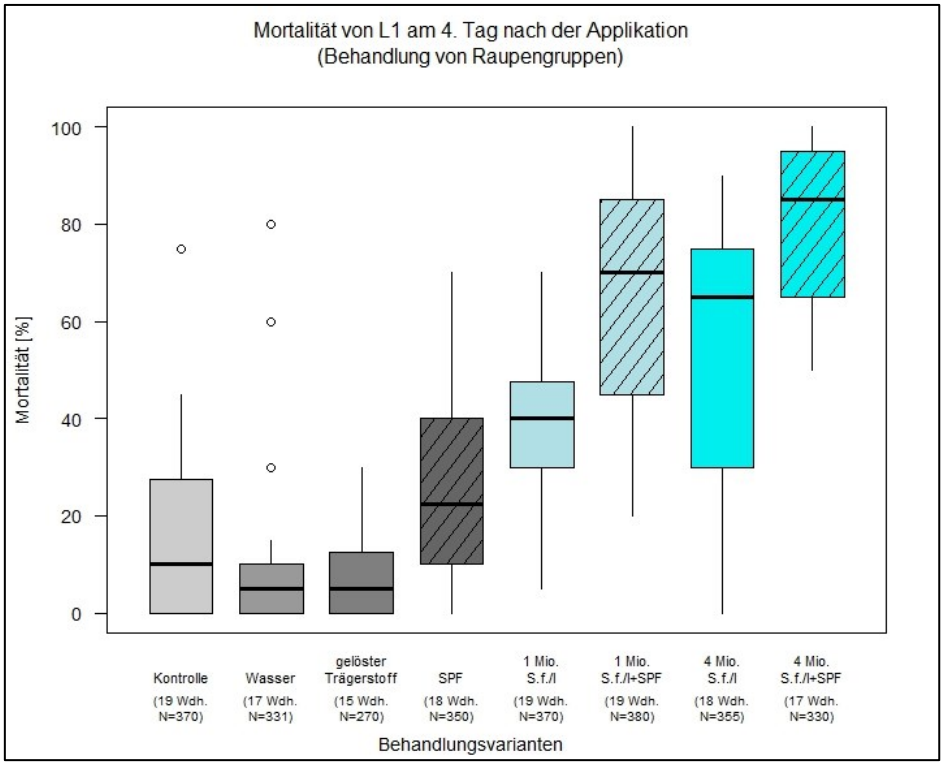


Abb. 23: Ergebnis der Labor-Bioassays an Raupengruppen des EPS (L1): Anteil abgestorbener Raupen am vierten Tag nach der Applikation für verschiedene Behandlungsvarianten, wobei Ergebnisse verschiedener Expositionszeiten zusammengefasst wurden. Wdh.= Anzahl der Wiederholungen, N= Anzahl aller Raupen (jede Wiederholung mit ≈20 Raupen). SPF= Surfactant Polymer Formulation.

Innerhalb einzelner Behandlungsvarianten wies die Mortalität große Spannweiten auf. Die Wirksamkeit von verschiedenen Varianten war nicht in allen Fällen sicher zu unterscheiden (Abb. 23).

Die Zugabe der Surfactant-Polymer-Formulation (SPF) steigerte auch gegenüber Raupengruppen die Mortalität. SPF allein erreichte wie bei Einzelraupen gegenüber der Kontrolle erhöhte Sterblichkeit. Die Applikation des gelösten Trägerstoffes führte nicht zu höherer Mortalität gegenüber den Kontrollgruppen oder gegenüber der Applikation von Leitungswasser.

Die Dauer der Exposition gegenüber applizierter Spritzflüssigkeit in abflusslosen Petrischalen beeinflusste die Mortalität der Raupen (Abb. 24). Je länger L1 einer Spritzsuspension mit *S. feltiae* ausgesetzt waren, desto höher war bei gleicher Behandlung die Mortalität am 4. Tag nach der Applikation.
Für Raupen, die während und nach Applikation auf einem Eichenast waren, kann die Expositionszeit nicht klar beurteilt werden. Ihre Mortalitätsrate entzieht sich der sicheren Interpretation.

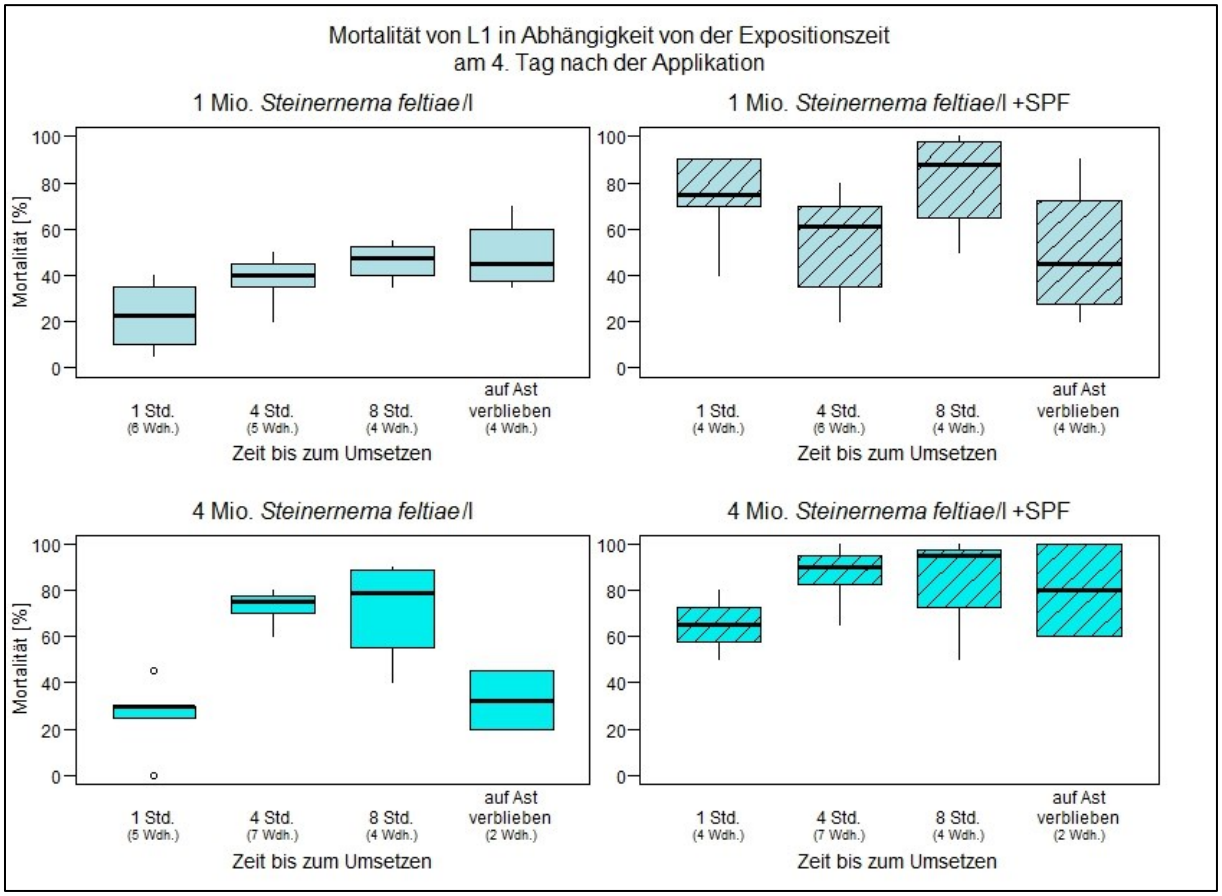


Abb. 24: Mortalität in Raupengruppen bei unterschiedlicher Expositionsdauer gegenüber Nematodensuspension: Anteil abgestorbener Raupen am 4. Tag nach der Applikation. Wdh. = Wiederholungen, jede Wiederholung mit etwa 20 Raupen.

Durch Sezieren abgestorbener Raupen aus behandelten Raupengruppen konnte gezeigt werden, dass Infektionen mit *S. feltiae* stattfanden (Tab. 6). Behandlung ohne *S. feltiae* führte nicht zu Infektionen.

Behandlungs-variante	Exposition	Anzahl sezierter EPS pro Behandlungs-variante	Anzahl Raupen, in denen eine Vermehrung von Nematoden nach-gewiesen wurde	Relativer Anteil Raupen mit nachgewiesener Nematoden-vermehrung [%]
1Mio S.f./l	4h in Petrischale	10	4	40
	8h in Petrischale	9	4	44
	auf Ast	5	2	40
1Mio S.f./l +SPF	4h in Petrischale	9	2	22
	8h in Petrischale	15	7	46
	auf Ast	5	0	0
4Mio S.f./l	4h in Petrischale	9	5	56
	8h in Petrischale	31	11	35
	auf Ast	6	3	50
4Mio S.f./l + SPF	8h in Petrischale	19	8	42
	auf Ast	8	2	25

Tab. 6: Ergebnisse aus der Sezierung von L1-Raupen des EPS, die mit Nematodensuspension behandelt wurden

3.1.2.1 Dosis-Wirkungsbeziehung beim L1-Stadium unter Laborbedingungen

Eine Dosis-Wirkungsbeziehung im Labor wurde für den Einsatz von *S. feltiae* gegen Gruppen aus jeweils 20 EPS (L1) am vierten Tag nach Applikation festgestellt (Abb. 25).
Die Erhöhung der Konzentration von 2 Millionen S.f./l auf 16 Millionen S.f./l Spritzbrühe steigerte die Mortalität der L1-Stadien.

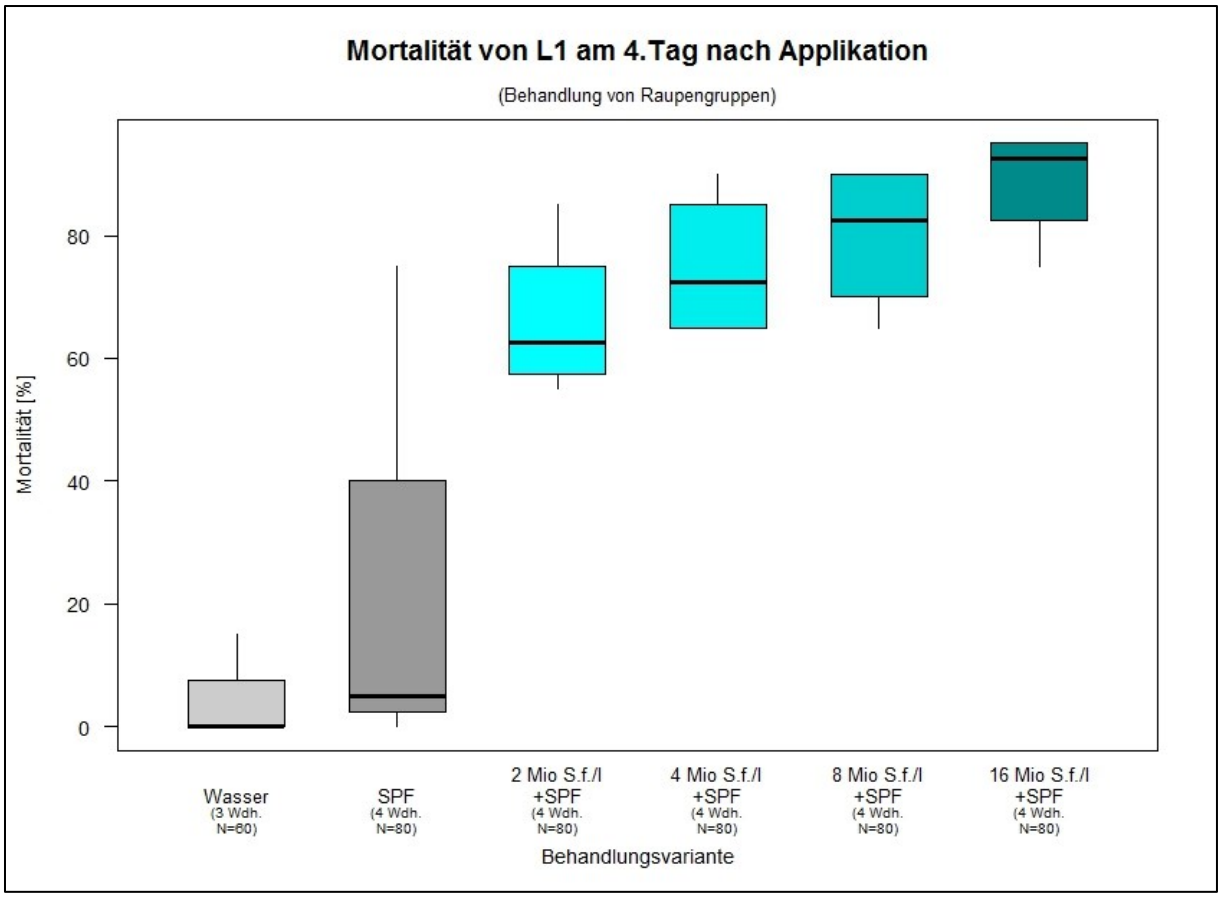


Abb. 25: Ergebnisse aus Labor-Bioassays mit Raupengruppen: Anteil abgestorbener EPS (L1) am vierten Tag nach Applikation in Abhängigkeit zur Behandlungsvariante. Wdh. = Wiederholungen, N= Anzahl aller Raupen.

3.1.2.2 Ergebnisse zu Formulierungszusatzstoffen

Änderungen der Formulierung durch Zugabe der Zusatzstoffe BreakThru oder NuFilm führten bei gleicher Konzentration der Nematoden zu höherer Mortalität der EPS als Formulierungen mit SPF (Abb. 26). Vier Millionen *S. feltiae* in Suspension mit SPF erreichten im Median das Absterben von etwa 50% der Raupen am vierten Tag nach der Applikation, bei Zugaben von BreakThru oder NuFilm lag der Anteil abgestorbener EPS über 60%.

Behandlungsvarianten mit NuFilm zeigten ohne *S. feltiae* keine oder nur sehr geringe Wirkung. Behandlungen mit *S. feltiae* ließen eine Dosis-Wirkungsbeziehung erkennen. Je höher die Konzentration des NuFilm in der Nematodensuspension desto höher war die Mortalität der EPS.

Behandlungen mit BreakThru-Formulierungen lieferten Ergebnisse mit einer weiten Varianz der Mortalitätswerte. Mischungen mit BreakThru sind sehr schwer zu homogenisieren, so dass die Dosis in einzelnen Tropfen möglicherweise stark schwankt. Mortalität von EPS nach Applikationen von BreakThru ohne *S. feltiae* deutete auf eine potentiell letale Wirkung des Netzmittels hin.

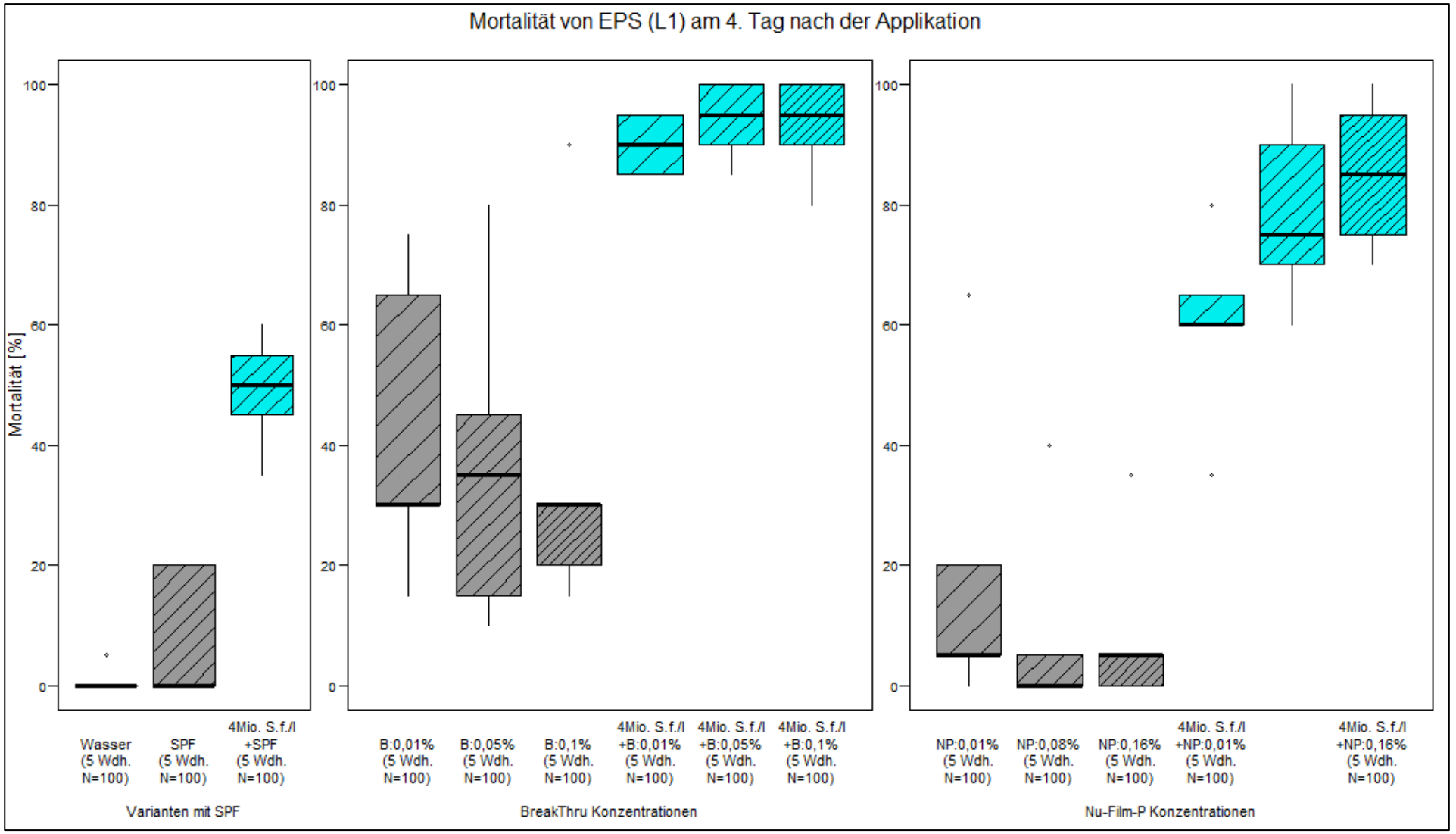


Abb. 26: Ergebnisse von Labor-Bioassays zu Formulierungszusatzstoffen: Anteil abgestorbener EPS (L1) am 4. Tag nach der Applikation in Abhängigkeit von der Behandlung (Wdh. = Wiederholungen, N= Anzahl aller Raupen, SPF= Surfactant Polymer Formulation, B= BreakThru, NP= NuFilm-P).

3.2 Dosis-Wirkungsbeziehung bei L4/L5-Stadien im Semi-Freiland

Eine Dosis-Wirkungsbeziehung beim Einsatz von *S. feltiae* wurde für L4/L5-Stadien des EPS festgestellt. Die Steigerung der Konzentration von *S. feltiae* im Bereich zwischen vier und 16 Millionen Nematoden je Liter Spritzflüssigkeit führte zu steigender Mortalität der Raupen (Abb. 27). Die Anteile abgestorbener Raupen lagen bei den großen Raupenstadien niedriger als in den Laborversuchen mit L1-Raupen. Eine Wirkung bei Applikation von SPF blieb im Gegensatz zu den Bioassays an L1 aus.

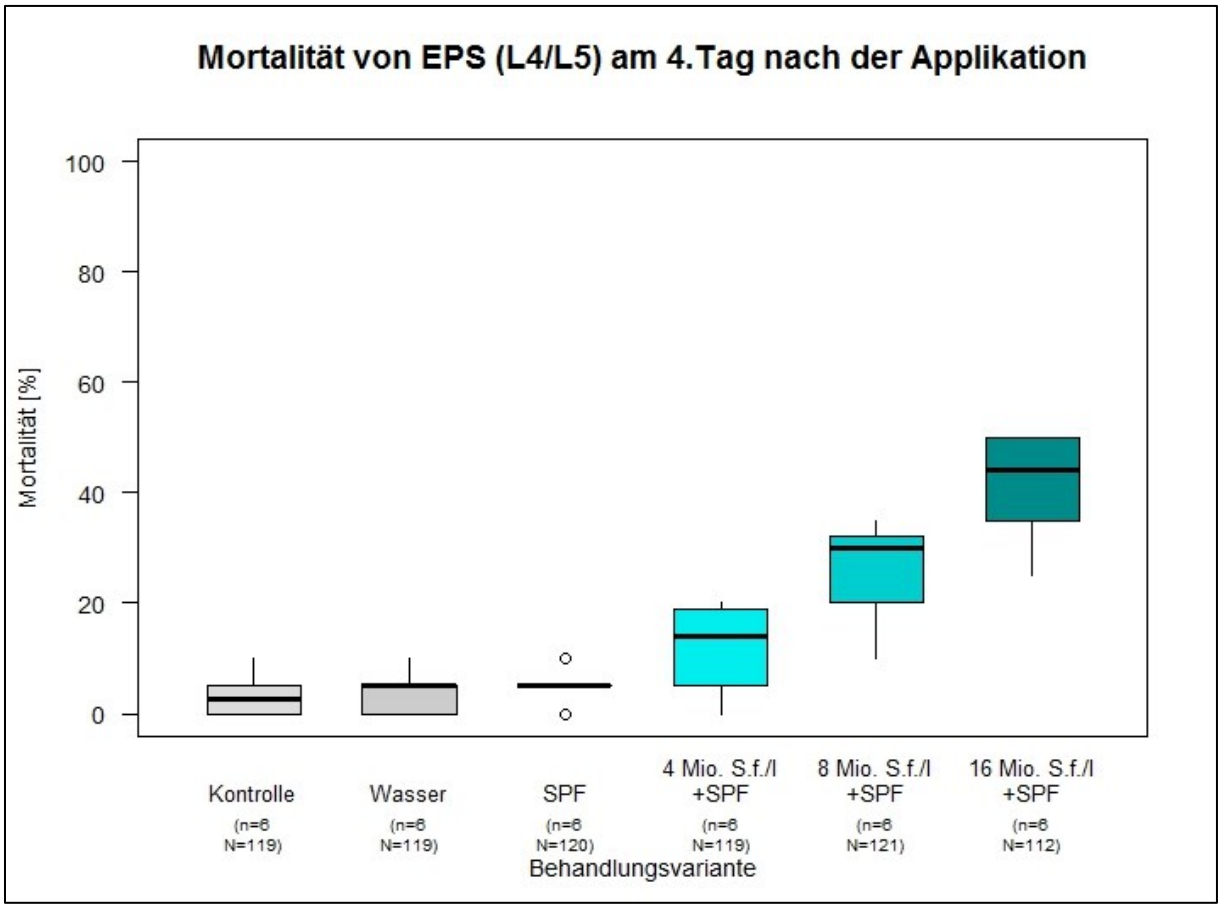


Abb. 27: Ergebnisse von Semi-Freiland-Bioassays an Raupengruppen des EPS (L4/L5): Anteil abgestorbener Raupen jeder Behandlungsvariante am vierten Tag nach Applikation. n= Anzahl der Wiederholungen, N= Anzahl aller Raupen. SPF= Surfactant Polymer Formulation.

3.3 Ergebnisse technischer Prüfungen

3.3.1 Düsentests

Insgesamt zeigten sich zwischen den Düsentypen nur geringe Unterschiede in der Qualität der applizierten Suspension (Abb. 29).

Bei den Düsentypen EXA, Tip Cap, FL, FD, PRE und SJ7 war der Anteil vitaler Nematoden nach der Düsenpassage am höchsten, gleichzeitig variierten bei diesen Düsentypen die Einzelergebnisse weniger stark.

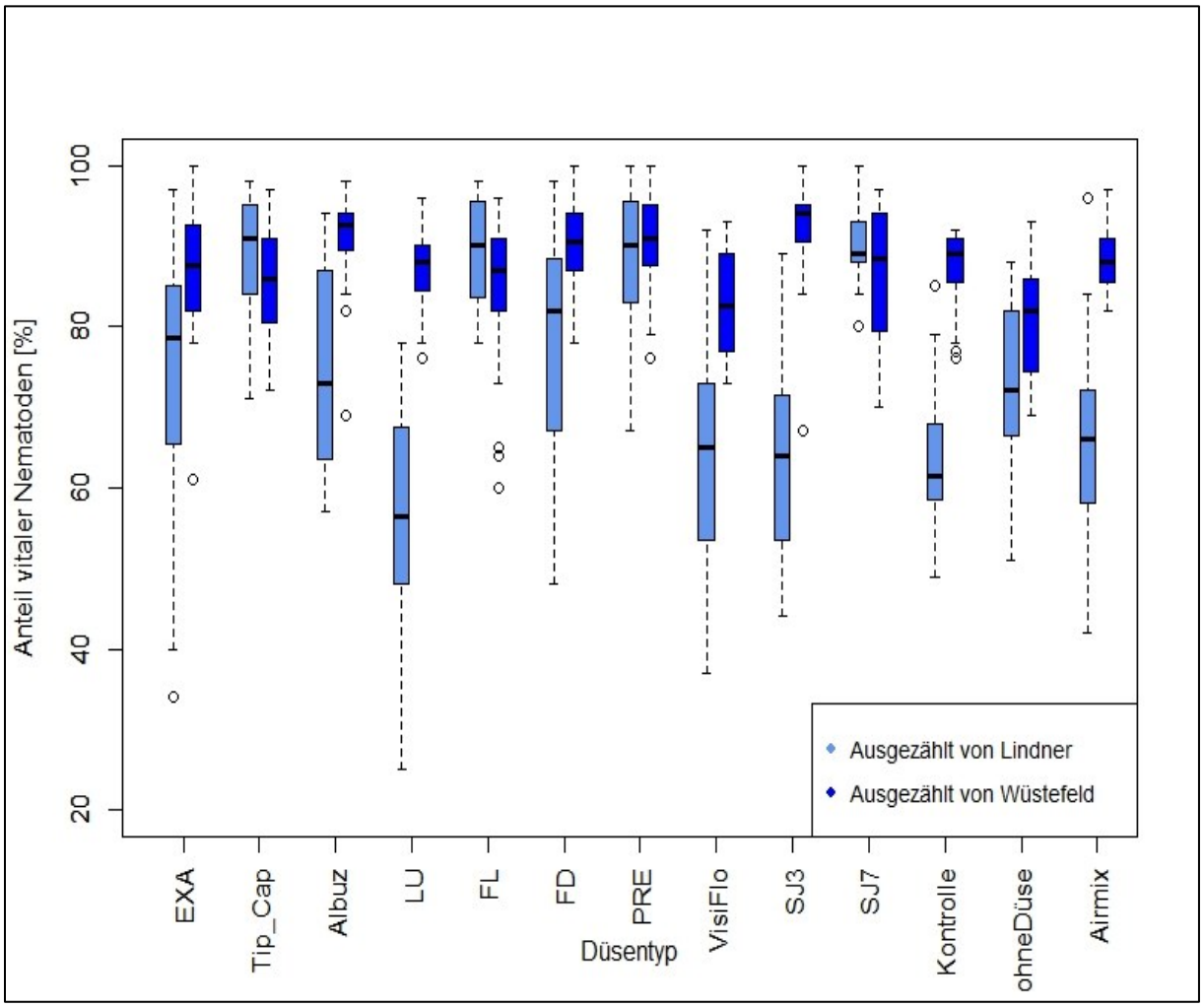


Abb. 29: Ergebnis von Düsentests: Anteile vitaler Nematoden in der Spritzsuspension nach dem Durchlauf durch verschiedene Düsen, ausgezählt von zwei verschiedenen Personen. Jede Behandlungsvariante und Versuchswiederholung mit 20 Pseudoreplikaten. Alle Versuche wurden mit 1,85 g der Surfactant-Polymer-Formulierung und einer Sollkonzentration von 1 Mio. S. feltiae pro Liter Spritzsuspension durchgeführt.

Es wurden Düsen mit verschiedenen Volumenströmen (ein Querschnitt der auf dem Markt verfügbaren Volumenströme) für die weiteren Spritzanlagentests ausgewählt (Tab. 7).

	Volumenstrom [l/min] bei 2 bar
Airmix	1.65
PRE	1.73
FL	1.96
LU	2.58
EXA	3.31
SJ7	4.82
Visi Flo	4.83
Tip Cap	5.23
SJ3	6.48
FD	6.53
Albuz	7.82

Tab. 7: Volumenströme von Testdüsen: Grün hinterlegt sind solche Düsen, die sowohl hinsichtlich des Anteils vitaler Nematoden als auch der Konzentration vitaler Nematoden in den Düsentests besser abschnitten.

Der Volumenstrom der FD-Düse war nominell zu hoch, da die Pumpe einen solchen Volumenstrom (bei 68 besetzten Düsenplätzen) nicht leisten kann. Der Düsentyp schied für weitere Überlegungen aus.

Da die PRE und die FL Düse hinsichtlich ihres Volumenstromes nah beieinander lagen (Tab. 7), die PRE Düsen aber vom JKI für den Anlagentest geliehen werden konnten (=keine zusätzlichen Kosten), wurde die PRE Düse für den Anlagentest ausgewählt.

Für Tests an der Spritzanlage des Hubschraubers wurden die folgenden Düsentypen ausgewählt:

- Dreiloch-Düse Albuz **EXA**, schwarz
- **Tip Cap** 110 -16, lila
- StreamJet SJ7-Lochdüse **SJ7**-15-VP, hellgrün
- Vorauflauf-Flachstrahdüse **PRE** 130-05

3.3.2 Prüfergebnis der Spritzanlage

Die Prüfung der Simplex-Spritzanlage mit ausgewählten Düsentypen ergab hinsichtlich der Qualität der Spritzflüssigkeit nur geringe Veränderungen. Die Temperaturerhöhung im Mischtank während 2,3 h Umwälzung und nach der Überführung in den Spritztank erreichte maximal 1,2°C, wobei auch für Praxiseinsätze kein höherer Anstieg erwartet wurde. Für die Nematoden wurde das als nicht schädlich eingestuft.
Die Anteile der vitalen Nematoden (Abb. 30) in der Spritzbrühe unterschieden sich bei verschiedenen Düsen und Stationen im Anlagentest kaum. Im Median streuten die Werte im Bereich der Mischtankproben, die als Kontrolle fungierten. Wesentliche Auswirkungen auf die Virulenz von Nematoden waren nicht feststellbar.

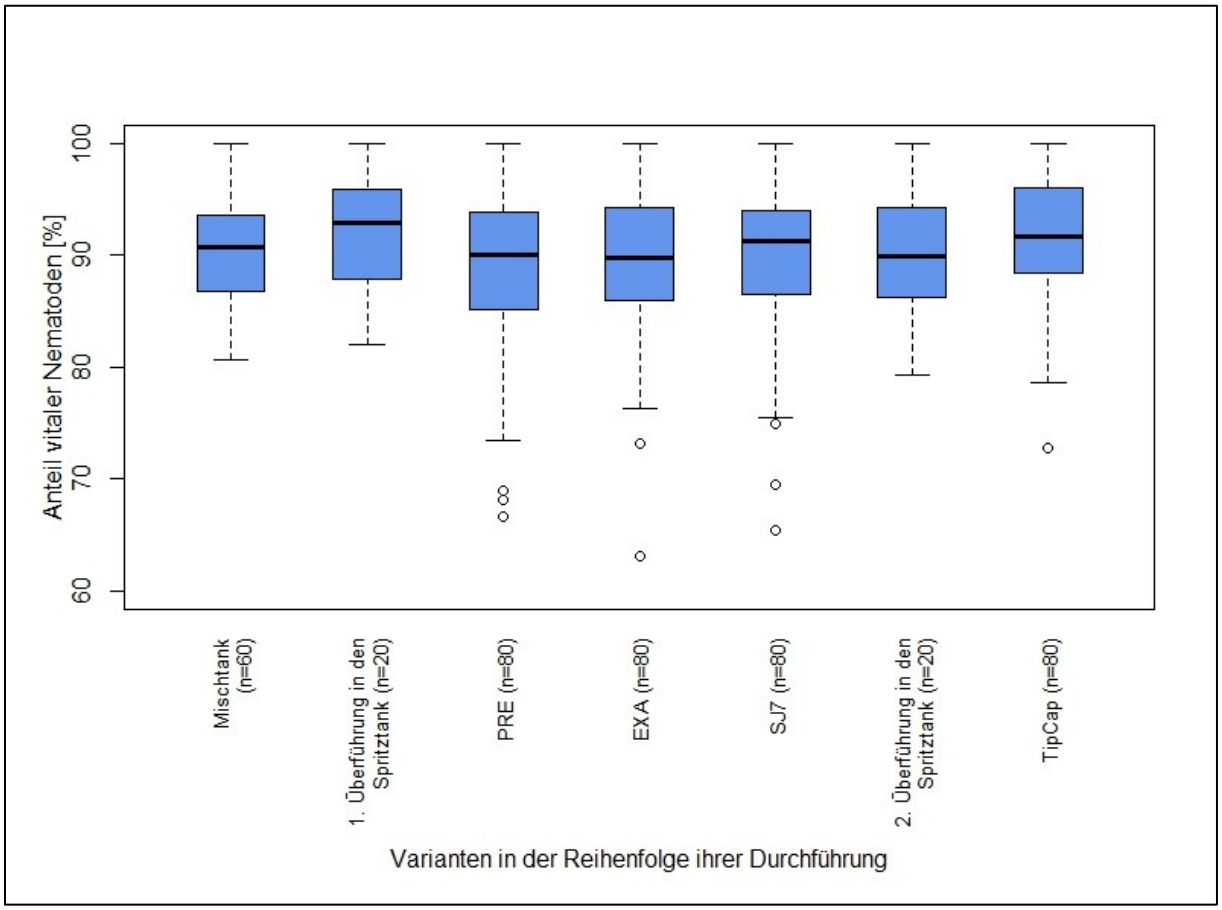


Abb. 30: Anteile vitaler Nematoden in der Spritzbrühe nach Durchlaufen der verschiedenen Anlagenkomponenten der Simplex 5100 Spritzanlage und verschiedener Düsentypen. n=Anzahl der untersuchten Pseudoreplikate.

Hinsichtlich des Volumenstroms und beim Spritzbild differenzierten die Düsentypen deutlicher (Abb. 31, 32). Die TipCap- und die SJ7-Düsen waren in der Lage viel Spritzsuspension auf die Fläche zu bringen, was die Wahrscheinlichkeit Raupen zu treffen, erhöhen und eine Austrocknung applizierter Nematoden verzögern sollte.

Die Freilandprüfungen wurden mit der SJ7-Düse geplant und umgesetzt.

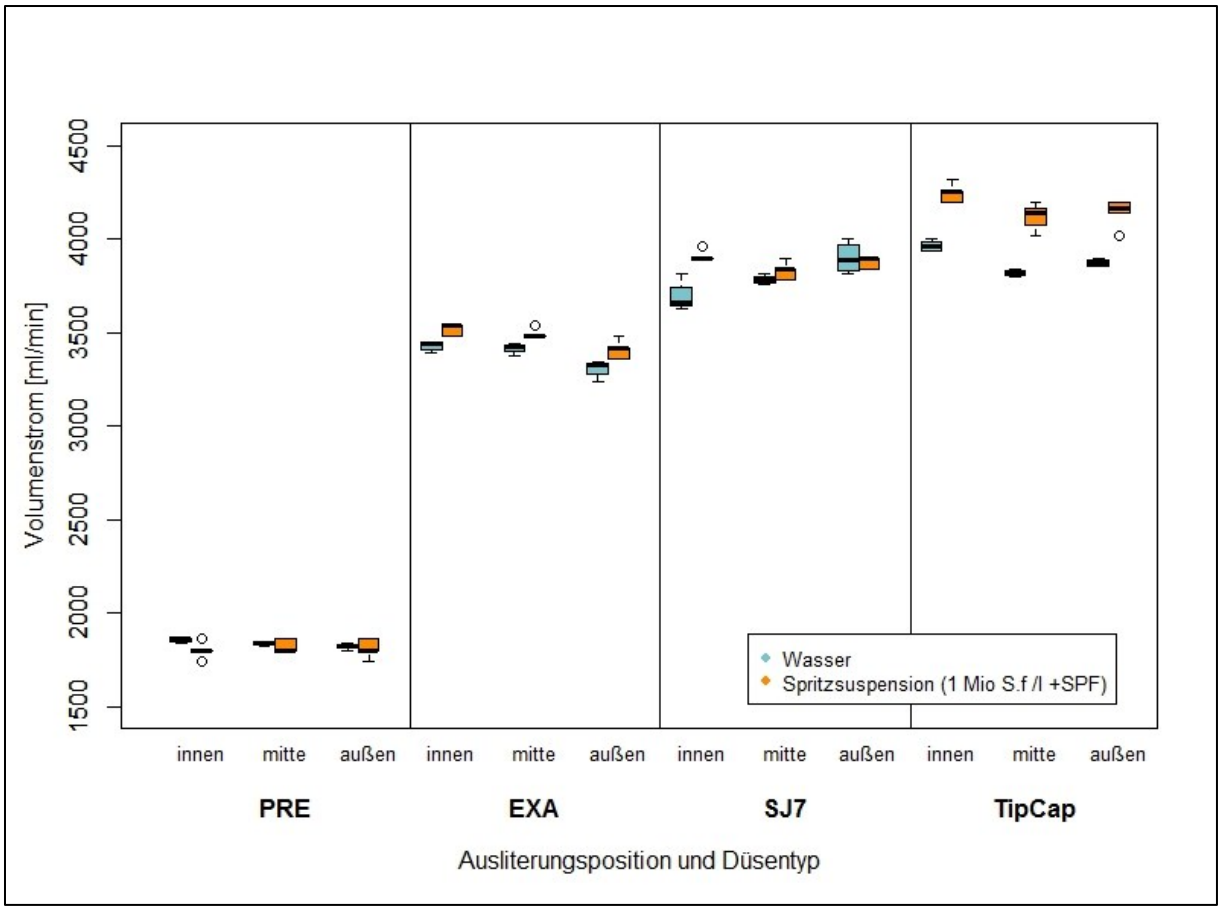


Abb. 31: Volumenströme an jeweils drei verschiedenen Düsenpositionen (von außen: 1, 16, 30) mit Wasser und mit Spritzsuspension in jeweils 5 Wiederholungen.

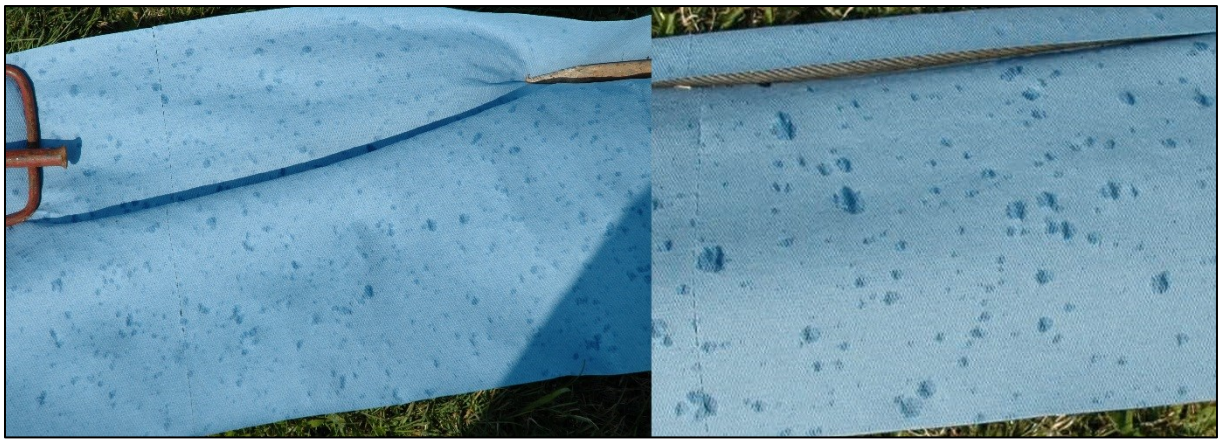


Abb. 32: Spritzbilder der TipCap Düse (links) und der SJ7 Düse (rechts).

Rechnerisch ergab sich für die SJ7-Düse aus dem Ausliterungsversuch ein mittlerer Volumenstrom (über alle Düsenpositionen) von 3,89 l/min pro Düse. Bei 68 besetzten Düsenplätzen entspricht das 260,6 l/min. Ausgehend von 20 m Arbeitsbreite und einer Vorwärtsgeschwindigkeit des Hubschraubers von 30 kn (= 55,6 km/h) kann der Hubschrauber 1,85 ha/min bespritzen und mit der SJ7 Düse 140,9 l/ha ausbringen.

3.4 Ergebnisse der Freilandversuche

3.4.1 Dichte des EPS-Vorkommens an Probebäumen

3.4.1.1 Nesterdichten des EPS

Am Standort Wirl war nach Applikation von 1 Millionen S.f./l in 2015 sowohl in der flächigen als auch in der Einzelbaumbehandlung ein Rückgang der Nesterzahl zu verzeichnen, während die Nesterdichte in der unbehandelten Kontrollgruppe anstieg. Der Rückgang der Nesterdichte war an den behandelten Einzelbäumen, auf die mehr Spritzsuspension und damit mehr *S. feltiae* appliziert wurde, stärker als auf Bäumen der flächigen Applikation (Abb. 33, 34). Die Ergebnisse aus Wirl könnten als Bekämpfungserfolg und als Beleg für eine Dosis-Wirkungsbeziehung gewertet werden, doch werden sie nicht durch vergleichbare Ergebnisse des Standortes Vehlgast bestätigt.

Nach der Applikation 2015 am Standort Vehlgast (Abb. 33, 34) stieg die Nesterzahl in beiden Behandlungsvarianten und in der unbehandelten Kontrolle sowie für alle Größenkategorien der Nester an. Hier war kein Bekämpfungserfolg zu verzeichnen.
Im Anschluss an die Applikation 2016 (8 Millionen S.f./l) wurde ein Rückgang der Nesterdichte an den unbehandelten Kontrollbäumen festgestellt, wohingegen die Nesterdichte an den Probebäumen der flächigen Behandlung und an den Einzelbäumen nur geringfügig von der Vorjahresdichte abwich.

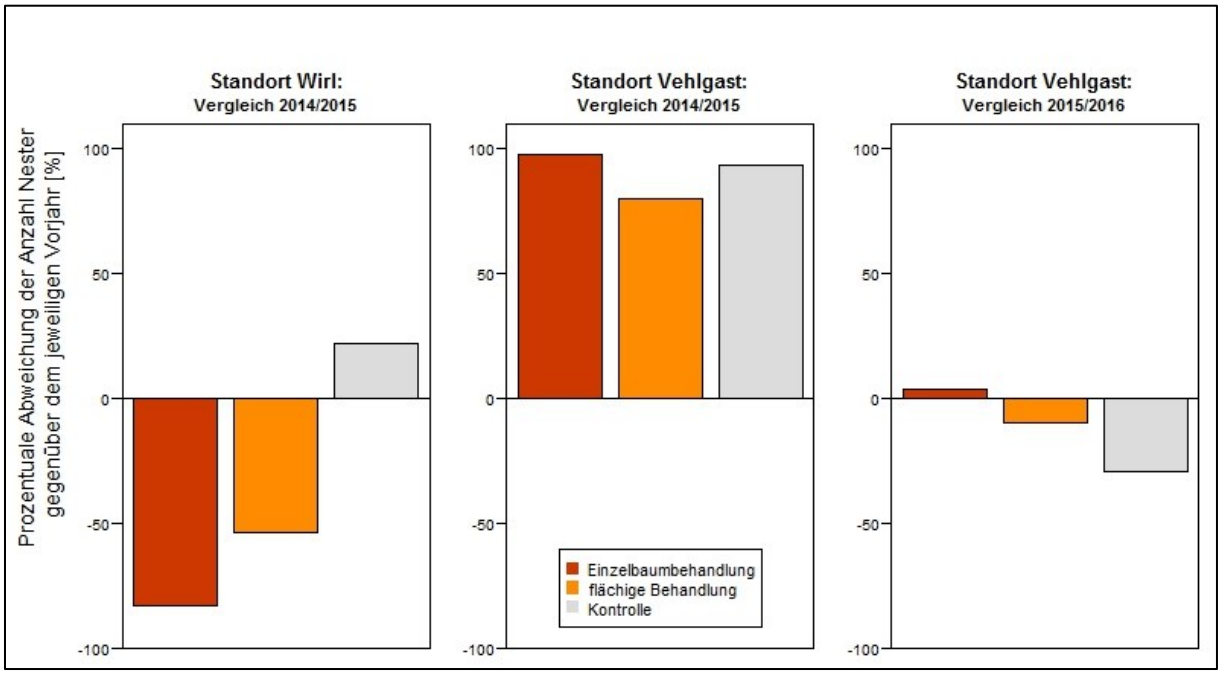


Abb. 33: Prozentuale Veränderung der Anzahl der EPS-Nester, getrennt nach Behandlungsvarianten. Links: Vergleich am Standort Wirl nach der Applikation im Freiland 2015 mit dem Vorjahr. Mitte: Vergleich am Standort Vehlgast nach der Applikation im Freiland 2015 mit dem Vorjahr. Rechts: Vergleich am Standort Vehlgast nach der Applikation im Freiland 2016 mit dem Vorjahr.

Die unterschiedlichen Dichteentwicklungen bei Nestern des EPS sind durch natürliche Populationsdynamik zu erklären. Nicht mehr austreibende Eichen und das Auftreten von Parasiten wiesen auf entsprechende Einflüsse hin (Abb. 35). Wirkung der Nematodenausbringung war hingegen nicht messbar. Daten zur Größe der Nester erlaubten ebenfalls keine Rückschlüsse auf eine Wirkung der Behandlung.

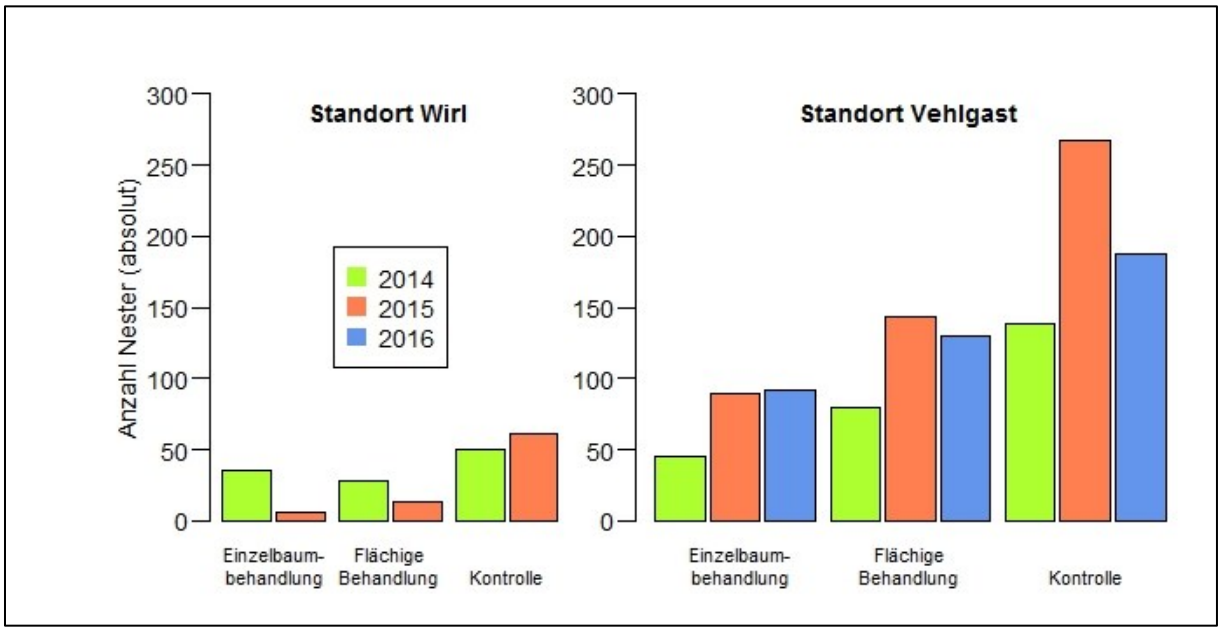


Abb. 34: Absolute Zahl der EPS-Nester an bonitierten Eichenzweigen, getrennt nach Behandlungsvarianten und Jahren der Bonitur. Links: am Standort Wirl. Rechts: am Standort Vehlgast.

Abb. 35: Befallsgebiet Vehlgast im Spätsommer 2016. Links: nach mehrjährigem Befall durch EPS abgestorbene Eiche am Damm zur Dosse, die im Vorjahr noch Laub getragen hatte. Rechts: Aus einem EPS-Nestfragment entfernte Puppen (mit orangem Punkt sind EPS-Puppen (50 St.), mit grünem Punkt Puppen von Parasiten (20 St., c.f. Tachinidae)).

3.4.1.2 Zahl der Eigelege

Die Applikationen von *S. feltiae* ließen an keinem der beiden Standorte eine hinreichende Wirkung auf die Abundanz der Eigelege erkennen.

Am Standort Wirl unterschied sich die Anzahl der Eigelege zwischen den Behandlungsvarianten und der Kontrolle nicht (Abb. 36 oben). In beiden Behandlungsvarianten und in der unbehandelten Kontrollgruppe wurde ein Rückgang der Gelegezahl beobachtet.

Am Standort Vehlgast fand nach der ersten Applikation 2015 ein Anstieg der Dichte der Eigelege in allen drei Behandlungsvarianten statt (Abb. 36). Der Anstieg war an Probebäumen, die einer Einzelbaumbehandlung unterzogen wurden, am größten, so dass kein Bekämpfungserfolg belegt werden konnte.
Nach der zweiten Applikation 2016 wurde ein Rückgang der Anzahl der Eigelege an den Probebäumen der Einzelbaumbehandlung und der unbehandelten Kontrollgruppe beobachtet. An Probebäumen der flächigen Behandlungsvariante war im Median ein leichter Anstieg der Anzahl Eigelege zu verzeichnen (Abb. 40).

Weder die Ergebnisse der Bonitur der Eigelege noch die Nesterzahlen konnten eine ausreichende Wirkung der Behandlung der EPS-Raupen mit Nematoden nachweisen.

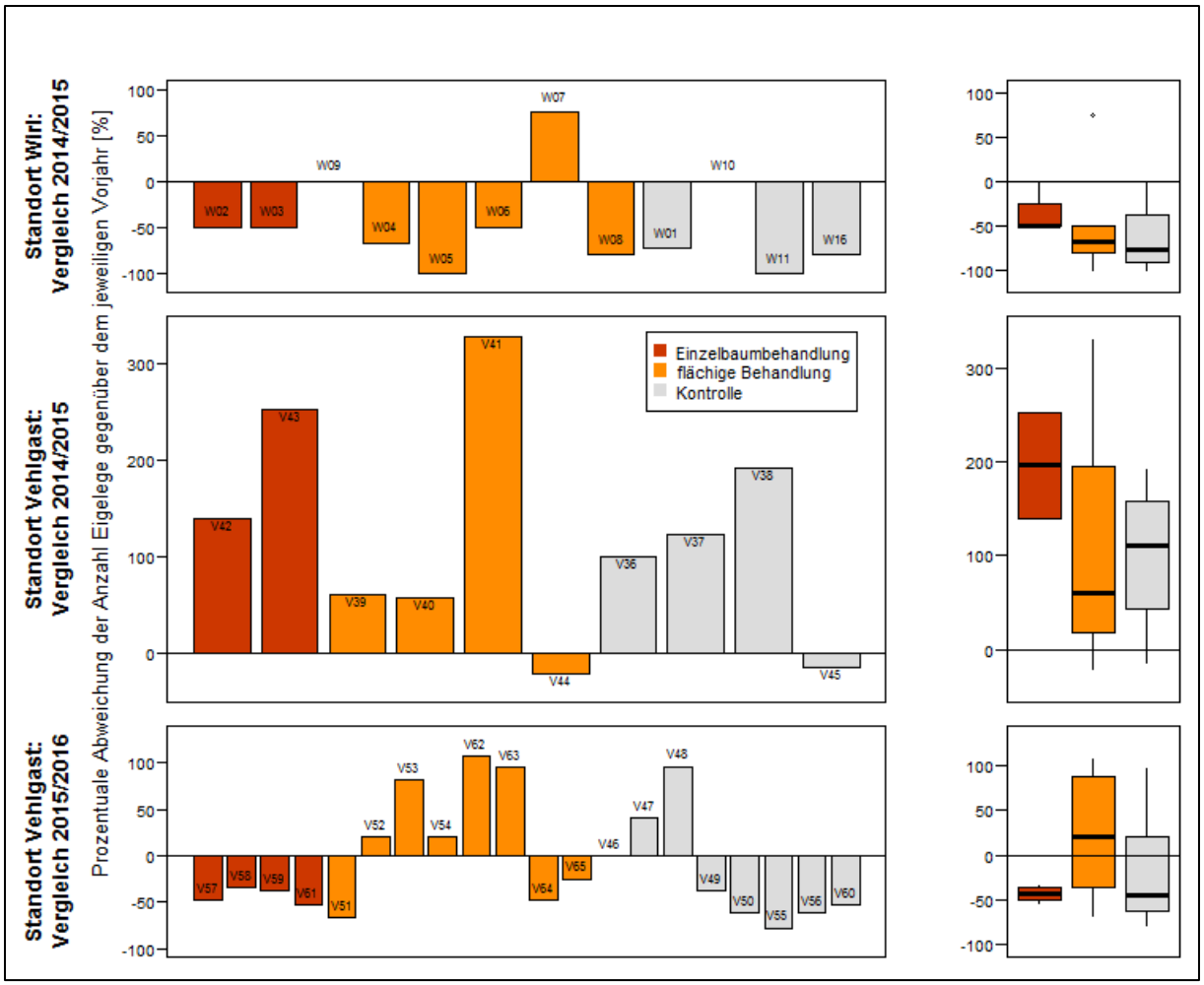


Abb. 36: Prozentuale Veränderung der Anzahl von Ei-Gelegen des EPS an bonitierten Eichenzweigen unterschieden nach Behandlungsvarianten. Oben: Vergleich am Standort Wirl nach der Applikation 2015 mit dem Gelegebestand des Vorjahrs. Mitte: Vergleich am Standort Vehlgast nach der Applikation 2015 mit dem Vorjahr. Unten: Vergleich am Standort Vehlgast nach der Applikation 2016 mit dem Vorjahr. Links sind jeweils die Ergebnisse pro Probebaum abgebildet (jeder Balken trägt die Nummer des entsprechenden Baumes), rechts sind die Ergebnisse zu Boxplots zusammengefasst.

3.4.1.3 Mortalität von EPS nach LFZ-Applikation unter Freilandbedingungen

Nach hubschraubergestützter Ausbringung von *S. feltiae* ergaben Bonituren der Raupenvitalität bei den abgesammelten Tieren aus unbehandelten Kontrollen keine oder nur sehr geringe Mortalität. Raupen von behandelten Bäumen zeigten eine etwas höhere, insgesamt allerdings nur geringe Mortalität (Abb. 37).

2015 lag die Mortalität am 3. Tag nach der Applikation im Median bei maximal 3,7% (Vehlgast Einzelbaumbehandlung), im Maximum eines Probebaumes bei 16% (Wirl, flächige Behandlung). Am Standort Vehlgast zeigten die Behandlungsvarianten eine Dosis-Wirkungsbeziehung: nach Einzelbaumbehandlung verstarb ein höherer Anteil der Raupen als nach flächiger Behandlung und beide Varianten zeigten höhere Mortalität als in der unbehandelten Kontrolle. Dagegen war am Standort Wirl die Mortalität nach Einzelbaumbehandlung vergleichbar mit den unbehandelten Kontrollen

und der höchste Anteil abgestorbener EPS trat nach flächiger Applikation auf (Abb. 37).

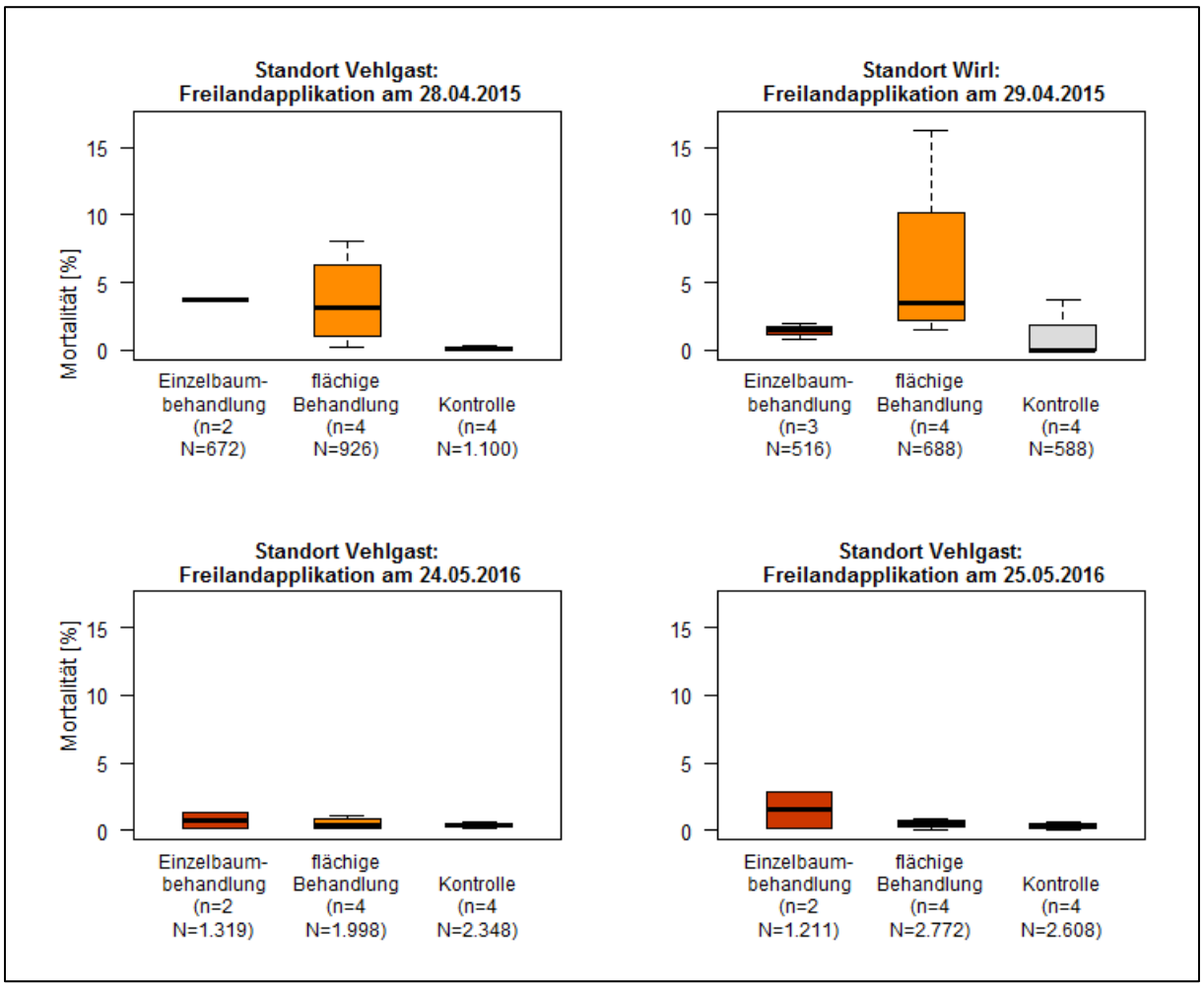


Abb. 37: Mortalität am 3. Tag nach hubschraubergestützter Applikation als kumulierter Anteil abgestorbener EPS-Raupen. Oben: Ausbringungen im Freiland in 2015 gegen L1/L2-Raupen. Unten: Ausbringungen im Freiland in 2016 gegen L3/L4-Raupen. (n = Anzahl der Probebäume, N= Anzahl bonitierter Raupen).

2016 lag die Mortalität am 3. Tag nach Applikation im Median bei maximal 1,5% (Einzelbaumbehandlung am 25.05.2016). Unterschiede zwischen den Behandlungsvarianten und der Dosierung waren nicht zu erkennen.

Die Klärung der *causa mortis* abgestorbener Raupen gelang nach methodischen Schwierigkeiten 2015 (s. Kap. 2.4.2.4) 2016 nur in Einzelfällen (Tab. 8) durch Nachweis von Nematoden in fünf verstorbenen Raupen.

Insgesamt konnte durch Applikationen im Freiland kein ausreichender Bekämpfungserfolg erzielt werden, obwohl die *S. feltiae* nach der LFZ-Applikation nachweislich virulent waren (vgl. Kapitel 3.1.4.2.4).

Standort, Applikations-datum	Behandlungs-variante	bonitierte Raupen je Eiche (N)	bonitierte Raupen je Behandlungs-variante (N)	verstorbene Raupen während Bonitur (12 Tg.)	Anzahl Raupen mit Nematoden-vermehrung
Vehlgast 24.05.16	Einzelbaum-Behandlung	762		18	0
		557	1319	5	**1**
	flächige Behandlung	474		6	0
		513		11	0
		516		13	**1**
		495	1998	8	0
	Kontrolle	592		6	0
		518		4	0
		512		6	0
		726	2348	5	0
Vehlgast 25.05.16	Einzelbaum-Behandlung	763		8	**1**
		448	1211	17	0
	flächige Behandlung	851		10	**2**
		616		2	0
		558		9	0
		747	2772	5	0
	Kontrolle	773		12	0
		640		9	0
		573		6	0
		622	2608	9	0

Tab. 8: EPS-Mortalität nach Applikation von Nematoden: Anzahl der Raupen zur Vitalitätsbonitur je Wiederholung und Behandlungsvariante sowie die Anzahl der Raupen, in denen Vermehrung der Nematoden nachgewiesen wurde.

3.4.2 Qualität der LFZ-Applikationen

3.4.2.1 Nematodendichte

Ergebnisse zur Zahl der in ausgebrachter Spritzsuspension enthaltenen Nematoden sind in Abb. 38 und 39 dargestellt. Es konnten nicht zu allen Applikationen valide Auswertungen vorgenommen werden. Bei der Einzelbaumbehandlung 2015 in Vehlgast besaß der ausgesuchte Baum eine zu große Krone, der Spritzteppich erreichte die ausgelegten Petrischalen nicht. Bei der Einzelbaumbehandlung am 25.05.2016 (Abb. 39) verfrachtete eine Windböe den Spritzteppich, so dass sehr wenig Spritzbrühe die ausgelegten Petrischalen erreichte.
In allen auswertbaren Fällen lagen die Nematodendichten der Befliegungen 2016 (8 Mio. S.f/l) über denen aus 2015 (1 Mio. S.f./l). Bei der Einzelbaumbehandlung war die applizierte Menge *S. feltiae* pro Flächeneinheit jeweils größer als in der flächigen Behandlungsvariante. Die Mediane der flächigen Behandlungsvariante lagen im ersten Behandlungsjahr (2015) bei ca. 180 Mio. Nematoden pro ha und damit ca. 100 Mio. unter dem angestrebten Wert (280 l/ha = 280 Mio. Nematoden/ ha). 2016 wurde bei den flächigen Behandlungen die entsprechende Nematodenmenge von 2,3 Mrd. *S. feltiae* pro ha erreicht (Abb. 39).

Der Anteil nicht vitaler Nematoden in der aufgefangen Spritzsuspension entsprach bei allen Applikationen im Freiland dem der jeweiligen Rückstellproben. Die Passage durch das Spritzsystem (Mischtank, Spritztank, Gestänge und Düse) und der freie Fall auf die Petrischalen fügte den *S. feltiae* keine Schäden zu.

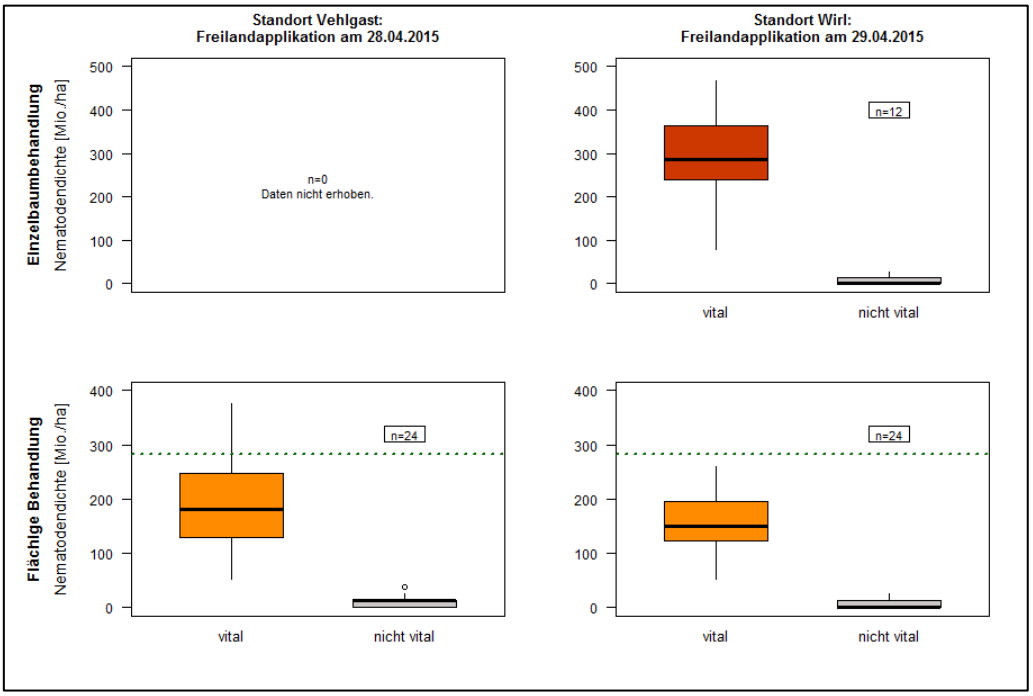


Abb. 38: Anzahl applizierter Nematoden [Mio/ha] bei den Ausbringungen 2015. Oben: Einzelbaumbehandlung. Unten: Flächige Behandlung. Die grün gestrichelte Linie markiert die rechnerisch ermittelte Ausbringungsmenge (282 Mio. S. feltiae/ha). n entspricht der Anzahl der Petrischalen.

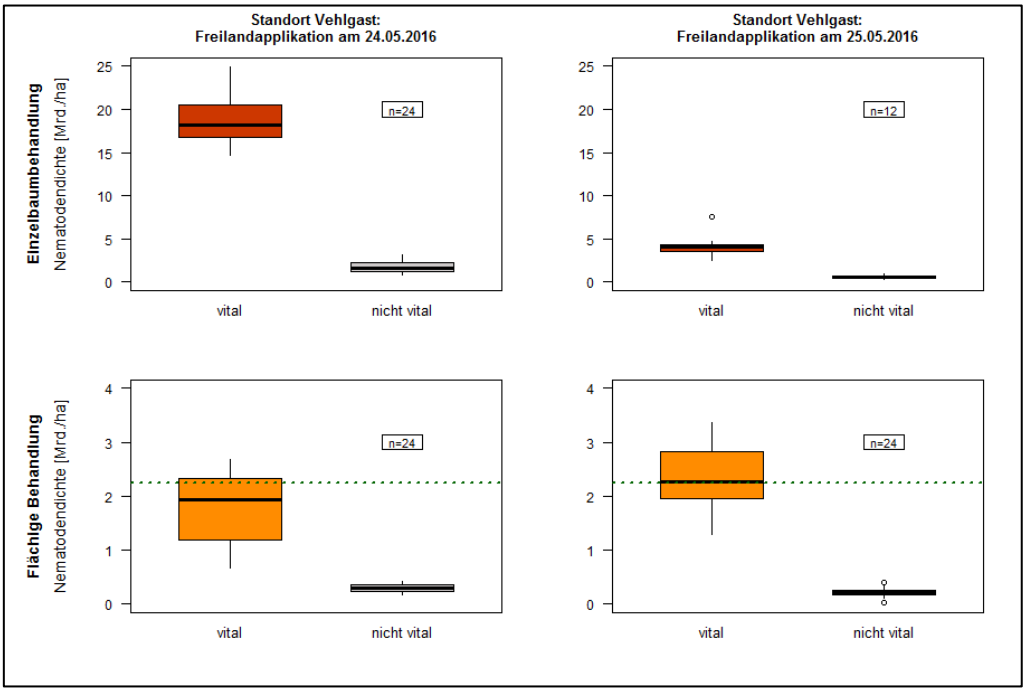


Abb. 39: Anzahl applizierter Nematoden [Mrd/ha] bei den Ausbringungen 2016. Oben: Einzelbaumbehandlung. Unten: Flächige Behandlung. Die grün gestrichelte Linie markiert die rechnerisch ermittelte Ausbringungsmenge (2,26 Mrd. S. feltiae/ha). n entspricht der Anzahl der Petrischalen.

3.4.2.2 Verdunstung applizierter Suspension

Nicht alle Behandlungen erfüllten die für erfolgreiche Infektionen als erforderlich angesehene Standzeit der applizierten Flüssigkeit über mindestens 3 Stunden.
2015 war Spritzbrühe bei flächigen Behandlung in Vehlgast nach 3:15 h vollständig abgetrocknet, in Wirl dagegen bereits nach 1:30 h. Zur Einzelbaumbehandlung erfolgte in Vehlgast keine Untersuchung, da der Spritzteppich die Petrischale nicht erreichte. In Wirl wurde die Beobachtung der Spritzsuspension um 23:30 Uhr eingestellt, da applizierte Tropfen nach 4:30 h nicht eingetrocknet waren.
Das vollständige Abtrocknen der Spritzbrühe nach 1:30 Std. in der flächigen Behandlung in Wirl am 29.04.2015 wirkte sich vermutlich negativ auf die Infektionsmöglichkeiten für *S. feltiae* aus.

2016 erfolgten die Applikationen am frühen Morgen und bei günstiger Witterung (vgl. 3.1.4.3). Die Zeitspannen bis zur vollständigen Abtrocknung der Suspensionstropfen waren länger als 2015 (Abb. 40, Tab. 9). Unabhängig von der Behandlungsvariante und dem Behandlungstag waren drei Stunden nach der Applikation mehr als 50% des Tropfenvolumens erhalten (Tab. 9).

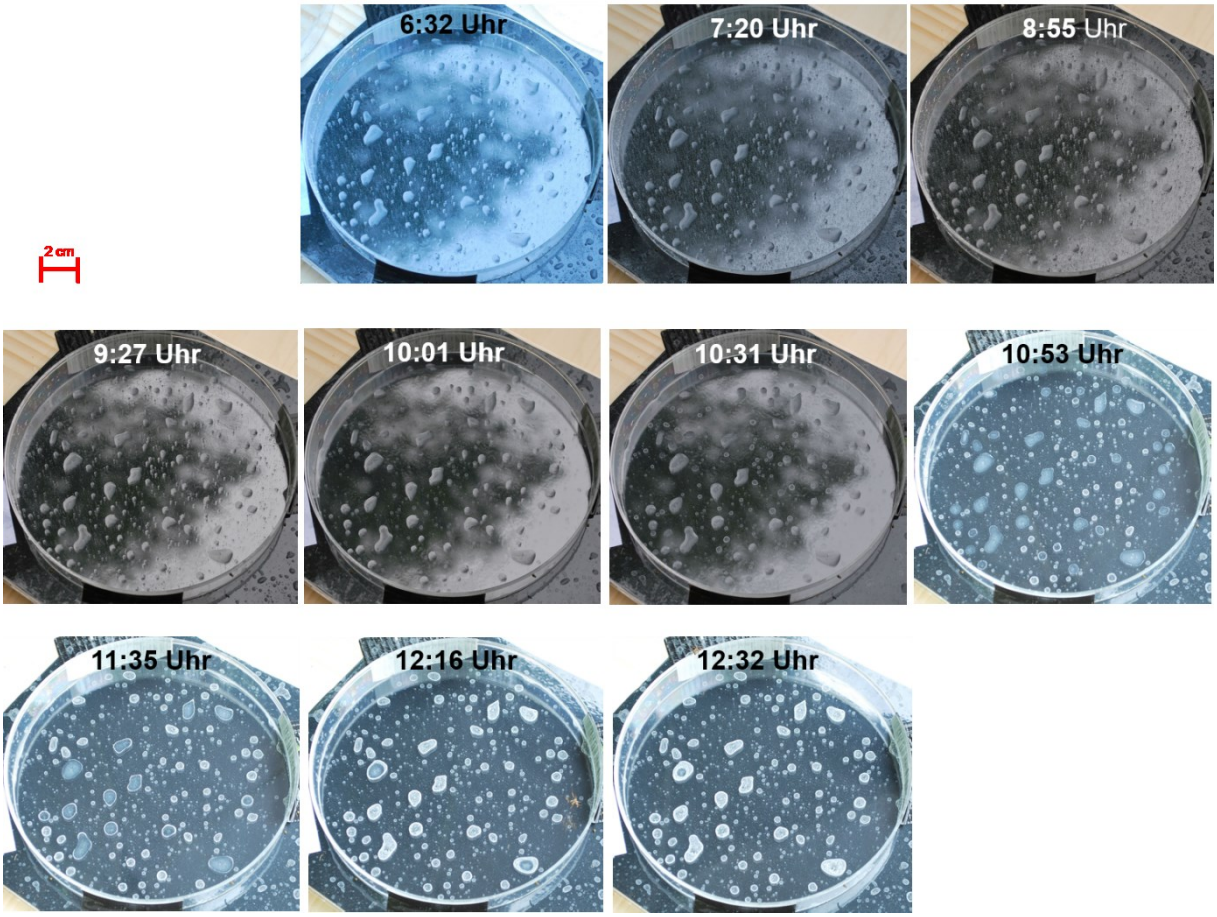


Abb. 40 Verdunstung der Spritzbrühe bei der flächigen Behandlungsvariante vom 25.05.2016: um 12:32 Uhr sind noch feuchte Stellen in den größeren Tropfen zu erkennen.

Behandlungs-variante	Applikation Datum, Uhrzeit [MESZ]	50% verdunstet um Uhrzeit [MESZ]	Zeit bis 50% der Tropfen verdunstet sind [h:mm]	90% verdunstet um Uhrzeit [MESZ]	Zeit bis 90% der Tropfen verdunstet sind [h:mm]
Einzelbaum-behandlung	24.05.2016, 7:46	13:22	5:36	14:50	7:04
	25.05.2016, 6:14	09:32	3:18	10:40	4:26
Flächige Behandlung	24.05.2016, 7:44	11:22	3:22	12:09	4:25
	25.05.2016, 6:38	11:11	4:33	12:02	5:24

Tab.9: Verdunstungsprotokoll für die Applikationen im Freiland 2016. MESZ= Mitteleuropäische Sommerzeit.

3.4.2.3 Tropfengrößen und Benetzungsfläche

Bei Applikationen im Freiland wurde bei den Einzelbaumbehandlungen mehr Blattfläche benetzt (bis 100%) als bei flächiger Behandlung (Abb. 41).
Bei den Einzelbaumbehandlungen führte die Lage der Probennahme relativ zum tatsächlichen Spritzteppich in zwei von vier Fällen zu reduzierten Werten. Die Einzelbaumbehandlungen in Vehlgast am 28.04.2015 und am 25.05.2016 (Abb. 41) konnten nicht valide ausgewertet werden. Andererseits wirkte sich eine Mehrapplikation auf die Ergebnisse aus. Eine zusätzliche Spritzbahn für die Behandlung der Kronenperipherie am 25.05.2016 bei der flächigen Behandlung (Abb. 43 rechts) ergab gegenüber der vergleichbaren Behandlung am Vortag höhere Benetzungsflächen.

Bei den flächigen Behandlungen fiel auf, dass die Applikationen 2015 weniger Fläche benetzten als die Applikationen 2016 (Abb. 41 untere Reihe). Wie bereits bei den Ergebnissen zur Nematodenzählung beschrieben (vgl. 3.4.2.1), wurde 2015 weniger Spritzsuspension appliziert als vorgesehen war.

Interzeption von Spritzflüssigkeit im Kronenraum war durch den Vergleich der Probennahmen „auf Kronenhöhe“ und „unter dem Baum“ bei flächigen Behandlungen in drei von vier Fällen deutlich zu erkennen (Abb. 41 untere Reihe). Je größer die applizierte Menge Spritzsuspension, desto größer war der Anteil der Interzeption. In den Einzelbaumbehandlungen vom 29.04.2015 und 24.05.2016 wurde keine Interzeption beobachtet: Hier wurde überschirmt „unter dem Baum“ mindestens so viel oder mehr Fläche benetzt wie frei „auf Kronenhöhe“. Abweichungen, wie bei der Applikation am 29.04.2015 am Standort Wirl, stehen mit einem geringen Belaubungsgrad des Probebaumes in Zusammenhang.
Bei den flächigen Behandlungen blieb trotz der geringeren Applikationsmengen im Vergleich zur Einzelbaumbehandlung insgesamt ein höherer Anteil der Spritzsuspension in der Krone.

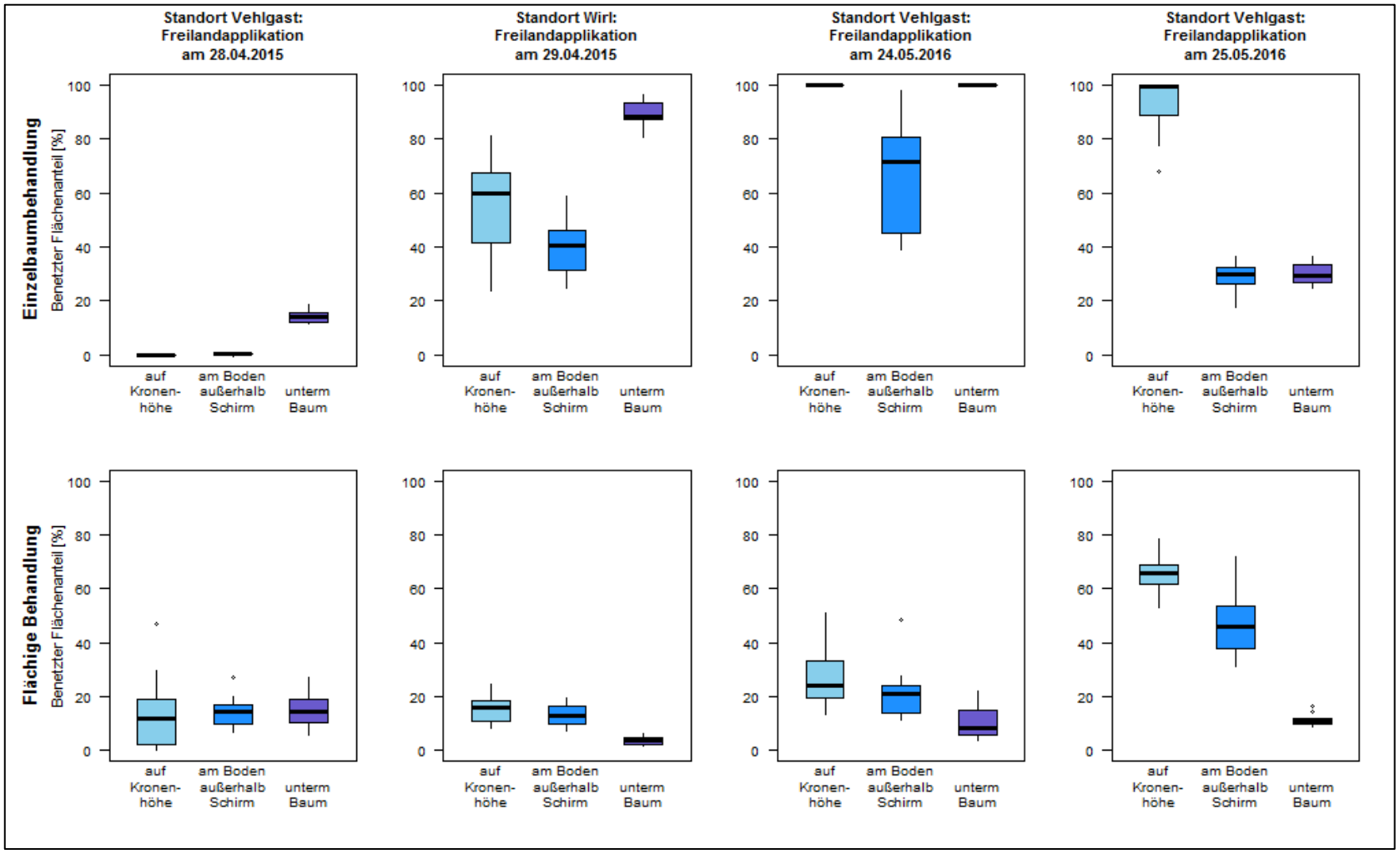


Abb. 41: Benetzter Flächenanteil von wassersensitiven Papierstreifen bei hubschraubergestützten Applikationen (nur Papierstreifen, die nach oben zeigend angebracht waren). Unterschieden wird zwischen der Behandlungsvariante und der Position der Probennahme relativ zum Baum. Jede Kategorie mit 16 Wiederholungen. Oben: Einzelbaumbehandlungen. Unten: Flächige Behandlungen.

Bei den Applikationen 2015 wurden in den Kronen (Holzkreuze an der Hebebühne) wassersensitive Papierstreifen nicht nur mit einer Ausrichtung nach oben angebracht, sondern auch seitlich sowie unterhalb des Holzkreuzes. Die Ergebnisse zeigten, dass seitlicher Spritzauftrag kaum stattfand und eine Benetzung der nach unten ausgerichteten Papierstreifen nicht auftrat (Abb. 44). Dies ist plausibel, da die SJ7-Düse große und schwere Tropfen produziert, die nicht oder kaum verwirbeln (Abb. 42) und somit Blatt- oder Triebunterseiten nicht erreichen.

Abb. 42: StreamJet SJ7 Düse während der Freilandapplikation in Vehlgast 2015.

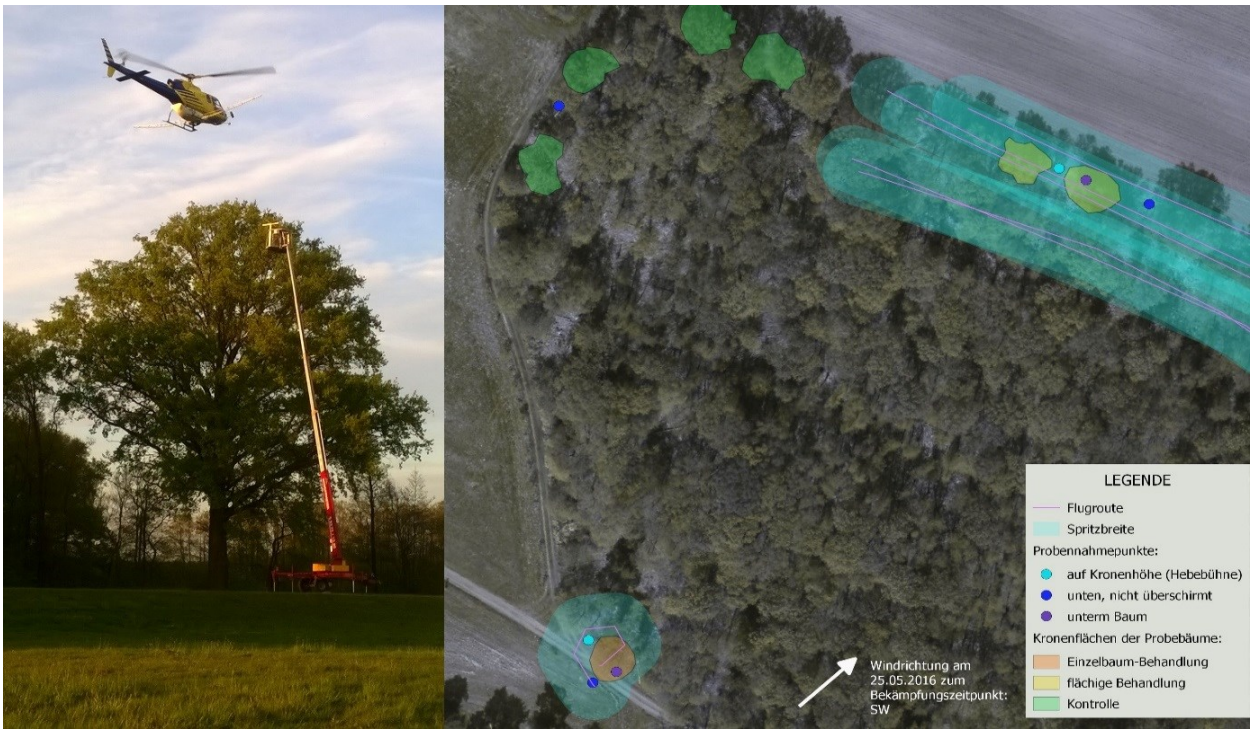


Abb. 43: Links: Einzelbaumbehandlung in Vehlgast am 28.04.2015. Probebaum mit ausladender Krone. Rechts: Mit QGIS bearbeitetes Luftbild (NW-FVA) der Bereiche, in denen in Vehlgast am 25.05.2016 die Applikationen im Freiland stattfanden. Eingezeichnete Flugrouten aus Trackingdaten des Hubschraubers dokumentieren eine teilweise dreifache flächige Behandlung. Eingezeichnete Spritzbreite basiert auf der in Vorversuchen ermittelten Spritzbreite von 20 m.

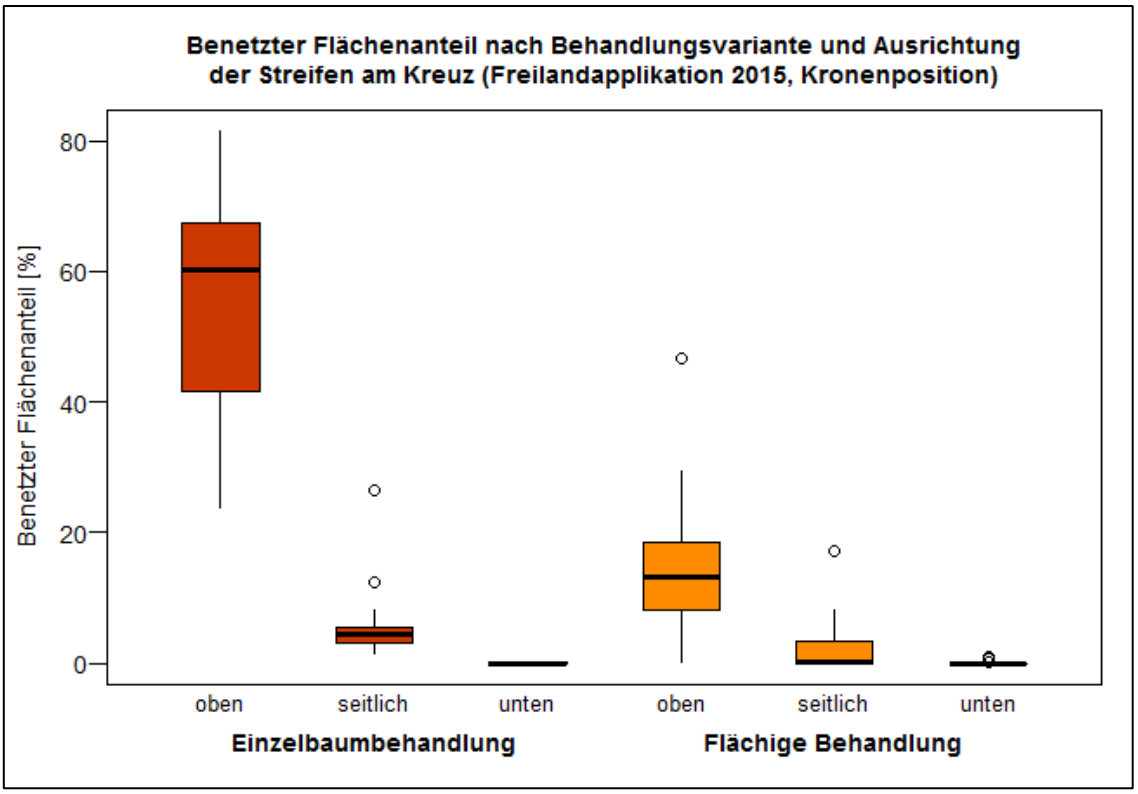


Abb. 44 Ergebnisse der Untersuchungen benetzter Flächenanteile auf wassersensitiven Papierstreifen. Es wurden nur Papierstreifen einbezogen, die auf Kronenhöhe angebracht waren (nur Daten aus 2015). Unterschieden wird zwischen den Ausrichtungen der Papierstreifen und der Behandlungsvariante. (Ohne Einzelbaumbehandlung Vehlgast, 28.04.2015.)

3.4.2.4 Virulenz von *Steinernema feltiae*

Virulenztests an EPS und an Wachsmottenlarven (*Galleria mellonella*) zeigten, dass die 2016 applizierte Spritzsuspension infektiöse *S. feltiae* in ausreichender Konzentration enthielt (Abb. 45). Während die Versuchstiere der unbehandelten Kontrolle nach der Ausbringung von Nematodensuspension vollständig vital blieben oder nur geringe Mortalität aufwiesen, zeigten behandelte Wachsmotten und behandelte EPS Infektion und Sterblichkeit bis 100% der Individuen.

Bei der Applikation im Freiland am 24.05.2016 (flächige Behandlungsvariante, zwei Überflüge, 282 l/ha Spritzbrühe) war am 3. Tag nach der Applikation eine Dosis-Wirkugsbeziehung zu erkennen (Abb. 45). Dabei lag der Median der Mortalität von EPS und Wachsmotte in der flächigen Behandlung bei ca. 60%, die der höher dosierten Einzelbaumbehandlung bei 100%. In der unbehandelten Kontrolle wurde bei Wachsmotten und EPS nur geringe Mortalität festgestellt. Am 25.05.2016 erreichte bei der Einzelbaumbehandlung der Spritzteppich nicht die ausgelegten Plastikschalen mit EPS (Abdrift durch Windböe). Die flächige Behandlung erfolgte an den Probenahmepunkten mit 423 l/ha (3 Überflüge), was eine vollständige Mortalität aller Versuchstiere durch Nematoden in den Schalen zur Folge hatte.

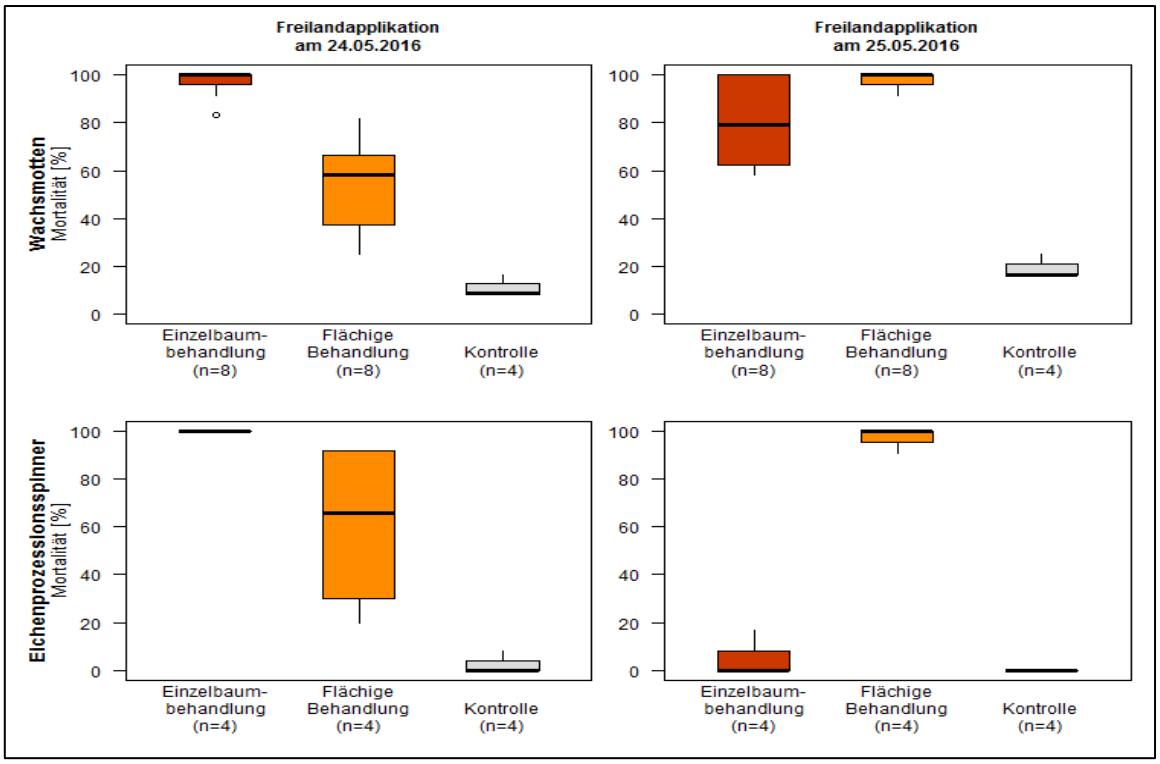


Abb. 45: Nachweis der Virulenz der applizierten Nematodensuspension. Oben: Mortalität von Wachsmotten (Larvenstadium unbekannt). Unten: Mortalität von EPS (L3/L4) jeweils am 3. Tag nach der Applikation unterschieden nach Behandlungsvarianten. (n=Anzahl der Wiederholungen mit jeweils 12 Versuchstieren (EPS oder Wachsmotten)).

Die Sezierung der abgestorbenen EPS wies überwiegend Befall mit *S. feltiae* als *causa mortis* nach (Abb. 46).

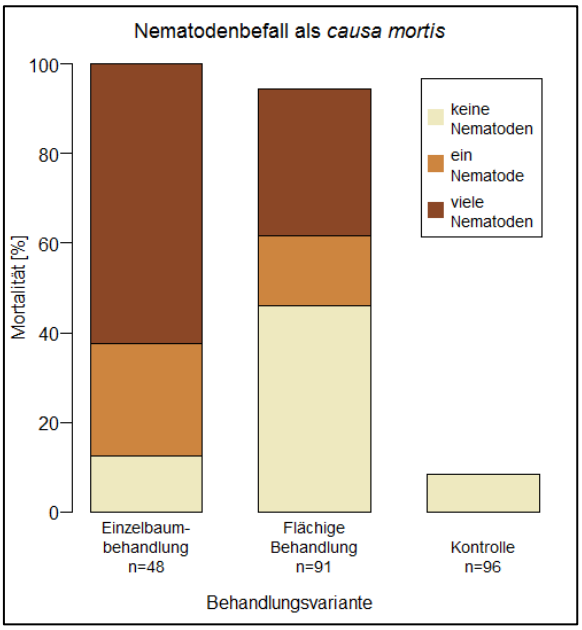


Abb. 46: Sezierung von abgestorbenen EPS (L3/L4) aus dem Virulenztest. Säulendiagramme zeigen den Anteil verstorbener Raupen jeder Behandlungsvariante. Die Häufigkeit des Nematodennachweises je Raupe ist farblich dargestellt. Raupen der flächigen Behandlung und der unbehandelten Kontrolle stammen aus zwei Applikationen (24. u. 25.05.2016), bei der Einzelbaumbehandlung aus der Behandlung am 24.05.2016 (n= Anzahl sezierter Raupen).

Die Ergebnisse des Virulenztests zeigten, dass sowohl der Mischtank als auch die Simplex 5100 Spritzanlage einschließlich aller verbauten Kreiselpumpen die Virulenz von *S. feltiae* in der Spritzbrühe nicht negativ beeinflussten. Dies steht im Gegensatz zu Schlussfolgerungen von Fife *et al.* (2007), die Kreiselpumpen aufgrund ihres Vermögens, die Temperatur der Spritzsuspension während der Umwälzung stark zu erhöhen, nicht für die Applikation von Nematoden empfehlen. Auch Brusselman (2010) wies nach, dass der Einsatz einer Kreiselpumpe das Überleben von Nematoden in einer Spritzbrühe negativ beeinflusst. Welche Druckspitzen (dynamischer Druck) im untersuchten Spritzsystem erreicht wurden, wurde nicht erfasst. Der statische Druck lag unter dem von Georgis (1990) für *S. carpocapsae* angegebene Maximaldruck von 300 psi[15] (≈20,7 bar). Der von Fife *et al.* (2007) angegebene Maximaldruck für *Heterorhabditis megidis* von 14 bar wurde nicht erreicht.

Das untersuchte, modifizierte Simplex 5100 Spritzsystem ist für die Ausbringung von *S. feltiae* geeignet.

3.4.3 Witterung

Die Witterungsbedingungen bei den Applikationen 2015 entsprach an beiden Standorten kaum den bekannten Anforderungen an eine hohe Mobilität der *S. feltiae* als Grundlage für möglichst zahlreiche Infektionen der EPS-Raupen. Die Rahmenbedingungen für Applikationen 2016 werden hingegen als günstig beurteilt. Die Bedeutung der Witterung wurde insbesondere durch unterschiedliche Verdunstung der Suspension deutlich (3.4.2.2).

2015 lag zum Zeitpunkt der Befliegung in Vehlgast die relative Luftfeuchte bei ca. 50% und stieg bis Mitternacht auf über 90% an, während die Temperatur von durchschnittlich 12,5 °C während der Befliegung teilweise (je nach Mikroklima) bis auf den Gefrierpunkt absank (Abb. 47).
Am Standort Wirl (2015) fand die Applikation bei ca. 14°C und weniger als 40% Luftfeuchte statt. Um Mitternacht nach der Applikation stieg die relative Luftfeuchtigkeit auf ca. 70% an. Ein starker Temperatursturz wie tags zuvor in Vehlgast blieb hier aus und die Temperatur sank bis auf ca. 8° C (Abb. 48).

[15] psi= pound-force per square inch [lb/in²]; 300 psi ≈ 2068 kPa ≈ 20,7 bar

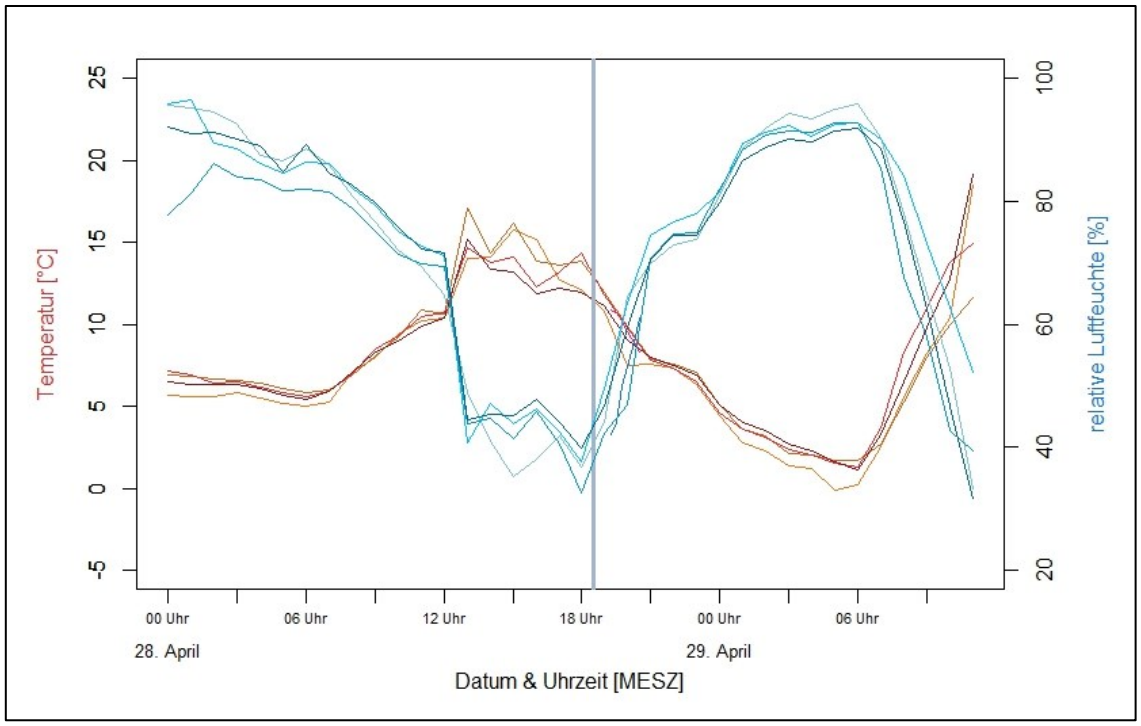


Abb. 47: Temperatur- (rot) und Luftfeuchtigkeitsverlauf (blau) vor, während (18:30 Uhr, graue senkrechte Linie) und nach Applikationen 2015 in Vehlgast. Die einzelnen Kurvenverläufe zeigen Aufzeichnungen verschiedener Voltcraft Datenlogger und einer Davis Wetterstation.

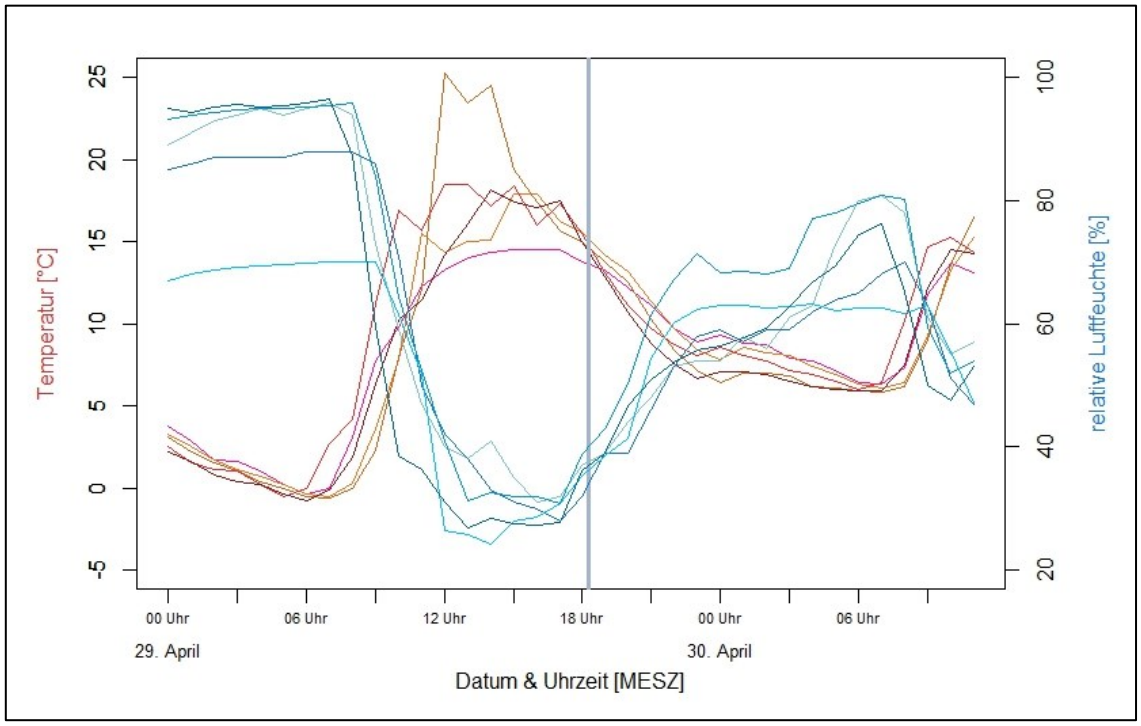


Abb. 48: Temperatur- (rot) und Luftfeuchtigkeitsverlauf (blau) vor, während (18:10 Uhr, graue senkrechte Linie) und nach Applikationen 2015 in Wirl. Die einzelnen Kurvenverläufe zeigen Aufzeichnungen verschiedener Voltcraft Datenlogger und einer Davis Wetterstation.

2016 waren die Temperaturen während der Applikationen mit 12° bis 18°C in einem Bereich, der für das Überleben und die Mobilität von *S. feltiae* als sehr günstig

einzustufen ist (Abb. 48). Am ersten Behandlungstag (24. Mai) sank die relative Luftfeuchte nie unter 80%, tags drauf fiel sie bis mittags auf 70%, um dann wieder anzusteigen.

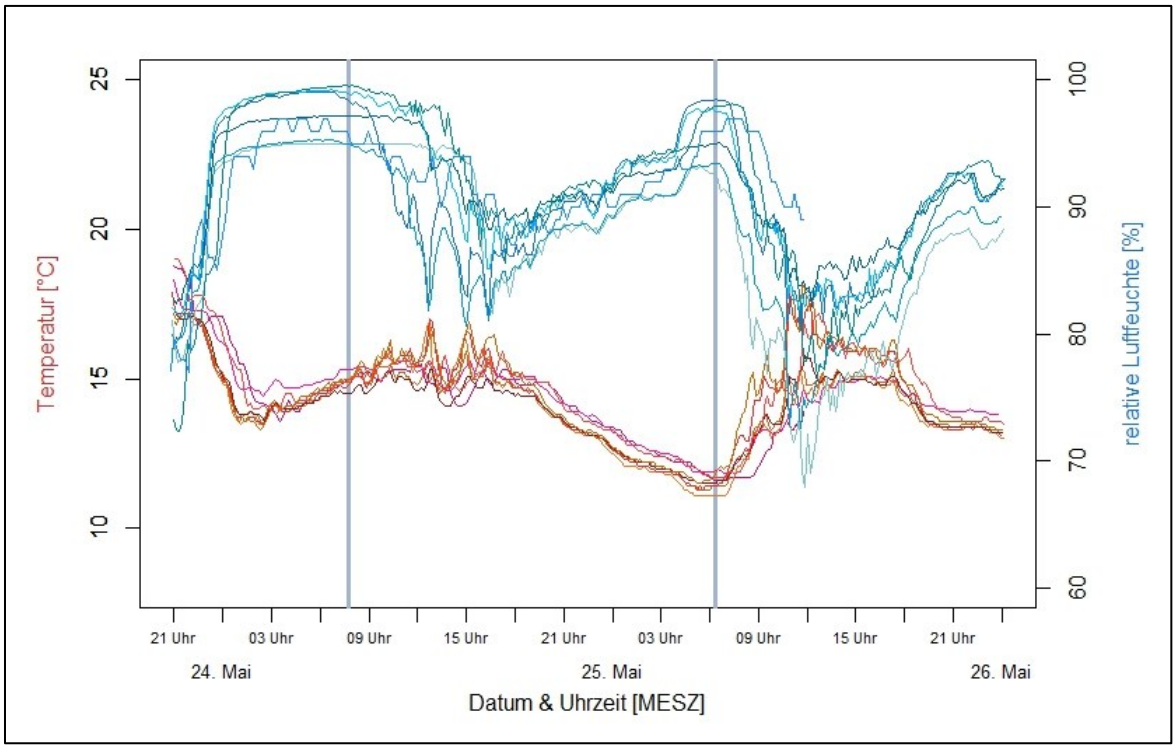


Abb. 49: Temperatur- (rot) und Luftfeuchtigkeitsverlauf (blau) vor, während (graue senkrechte Linie) und nach Applikationen 2016 in Vehlgast. Die einzelnen Kurvenverläufe zeigen verschiedene Voltcraft Datenlogger und zwei Davis Wetterstationen.

3.5 Voraussichtlicher Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Methode zur Applikation von *S. feltiae* mit dem Hubschrauber gegen Raupen des EPS konnte nicht bis zur Praxisreife entwickelt werden, obwohl die Wirksamkeit von *S. feltiae* auf EPS Raupen im Labor und im Semi-Freiland nachgewiesen wurde und die hier vorgestellte Gerätekonfiguration für die Ausbringung virulenter S.f.-Nematoden geeignet ist. Es besteht Bedarf für weitere Forschung (vgl. Kapitel 5), deren Erfolgsaussichten auf Grund der vorgelegten Ergebnisse positiv eingestuft werden. Erarbeitete Methoden zur Überprüfung der Wirksamkeit im Freiland sowie zur Überprüfung der Ausbringungsqualität sind adäquat und können bei folgenden Freilanduntersuchungen eingesetzt werden.

4. Zusammenfassung

Die Wirksamkeit von *S. feltiae* gegen verschiedene Stadien von EPS-Raupen konnte zunächst im Labor an Raupen des L1-Stadiums und im Semi-Freiland an L4/L5-Raupen nachgewiesen werden. L1-Raupen zeigten im Labor am 4. Tag nach Applikation von *S. feltiae* eine Mortalität von 40-100%. Je höher die Konzentration von *S. feltiae* in der Spritzsuspension und je länger EPS der Suspension ausgesetzt waren, desto höher stieg die Mortalität der Raupen.

Darüber hinaus beeinflussten die Zusammensetzung der Suspension und die Konzentrationen beigemischter Formulierungszusatzstoffe die Mortalität der EPS im Labor. Als verdickende Komponente der Formulierung wurde Xanthan eingesetzt, als Netzmittel wurden BREAK-THRU® S240 oder NU-FILM®-P variiert.
Je höher die Konzentration von NU-FILM®-P in der Spritzsuspension war, desto höher lag die Mortalität der EPS bei gleicher *S. feltiae*-Konzentration. Behandlungen mit einer vergleichbaren NU-FILM®-P Konzentrationsreihe ohne *S. feltiae* zeigten keine Dosis-Wirkungsbeziehung.
Behandlungsvarianten mit BREAK-THRU® S240 lieferten stark gestreute Ergebnisse zur Raupenmortalität. Das galt für Behandlungsvarianten mit *S. feltiae* in der Spritzsuspension und besonders für Behandlungsvarianten ohne *S. feltiae*.
Die von der Firma e-nema gelieferte Surfactant-Polymer-Formulation (SPF) wurde zum Vergleich mit den anderen Formulierungen ebenfalls im Versuch eingesetzt. Behandlungen mit SPF ohne weitere Zusätze lieferten bei geringer Streuung der Ergebnisse eine geringe Mortalität bei EPS.
Die Ergebnisse der Laborversuche legen nahe, dass Xanthan und NU-FILM®-P eine katalytische Wirkung auf die Infektiosität von *S. feltiae* an EPS-Raupen hatten. BREAK-THRU® S240 hatte möglicherweise selbst eine letale Wirkung auf EPS.

Applikationen im Freiland erfolgten vom 28.-29.04.2015 gegen L1- bis L2-Stadien des EPS in Eichenbeständen bei Vehlgast und Wirl sowie am 24. und 25.05.2016 gegen L3- und L4-Stadien in Vehlgast. Ausgebracht wurde die Spritzsuspension mit einem Simplex 5100 Spritzsystem an einer Écureuil AS 350 B2. Das Spritzgestänge wurde ohne *extensions* montiert und die 68 Düsenplätze mit StreamJet SJ7 Düsen bestückt, die sich in Vorversuchen als geeignet erwiesen.
Aufbauend auf dem jeweiligen Wissensstand wurden von 2015 zu 2016 das Zielstadium der EPS Raupen (zunächst L1/L2, dann L3/L4), der Tageszeitpunkt der Applikation (2015: spät abends, 2016: früh morgens) sowie die Konzentration von S.*feltiae* in der Spritzsuspension (2015: 1 Mio. *S.f.*/l + SPF, 2016: 8 Mio. *S.f.*/l +SPF) geändert.

Die Witterungsbedingungen bei den Applikationen 2015 hatten an beiden Standorten wahrscheinlich Relevanz für die Mobilität der *S. feltiae* (zu kalt) und für die Verdunstung der Spritzflüssigkeit (zu trocken). Für die Applikationen 2016 bestanden bei Ausbringung am frühen Morgen in einer wärmeren Jahresperiode (3. Maidekade) Bedingungen, die für eine Ausbringung von Nematoden sehr günstig waren.

Im Freiland konnte eine hinreichende Wirksamkeit von *S. feltiae* auf EPS-Raupen in vier unabhängigen Applikationen nicht gezeigt werden. Die maximal beobachtete Mortalität am dritten Tag nach der Behandlung lag im Median bei 5% der Raupen (nach flächiger Applikation von 282 l Spritzflüssigkeit je Hektar mit 1 Mio. *S. feltiae* je Liter am Standort Wirl, 2015). Die Nesterdichte und die Eigelegedichte waren an dem Standort nach der Applikation in allen Behandlungsvarianten gering.
Am Standort Vehlgast lag die Mortalität am dritten Tag nach der Applikation für beide Behandlungsvarianten im Median unter 4%. Die Anzahl der Nester und auch die Eigeledichten stiegen nach der Applikation 2015 in beiden Behandlungsvarianten an.

Trotz der insgesamt nicht zufriedenstellenden Wirkung im Freiland war die Qualität der hubschraubergestützten Ausbringung gut. Die Passage durch das Spritzsystem (Mischtank, Spritztank, Gestänge und Düse) fügte den *S. feltiae* keine Schäden zu und verringerte nicht die Konzentration der *S. feltiae* in der Spritzsuspension.
Bei der Applikation im Freiland 2016 wurde die Konzentration von *S. feltiae* in der Spritzbrühe gegenüber 2015 verachtfacht. In allen Fällen war die applizierte Menge *S. feltiae* pro Flächeneinheit in der Einzelbaumbehandlung größer als in der flächigen Behandlungsvariante.
Der Anteil der durch Applikation benetzten Fläche war bei Einzelbaumbehandlung höher (bis 100%) als bei flächiger Applikation (bis 70%).
Die Interzeption der Spritzsuspension war bei den flächigen Applikationen höher als bei den Einzelbaumbehandlungen.

Tests zur Virulenz der applizierten *S. feltiae* an *Galleria mellonella* (Wachsmotten) und EPS, die während der Applikation in Schalen ausgestellt wurden, bestätigten durch Mortalität beider Zielorganismen bei 60% - 100% in behandelten Varianten und nur geringer Mortalität in der unbehandelten Kontrolle (bis 10%) die grundsätzliche Wirksamkeit der ausgebrachten Spritzflüssigkeit.

Insgesamt konnte mit verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, dass der Aufenthalt im Mischtank wie auch die Passage der Simplex 5100 Spritzanlage einschließlich der Düsenpassage die Virulenz von *S. feltiae* im Spritzmittel nicht beeinträchtigte.

5. Gegenüberstellung der ursprünglich geplanten zu den tatsächlich erreichten Zielen mit Hinweisen auf weiterführende Fragestellungen

Ziel des Vorhabens war die Entwicklung einer praxistauglichen Methodik zur Applikation von *Steinernema feltiae* per Luftfahrzeug im Kronenraum von Eichen, um dort Raupen des Eichenprozessionsspinners (EPS) wirksam zu reduzieren. Die Projektlaufzeit betrug 3 Jahre (01.04.2014 – 31.03.2017).

In Versuchen konnte bewiesen werden, dass *S. feltiae* erfolgreich Raupen des EPS infizieren und abtöten kann. Der Wirkungsgrad von Behandlungen mit *S. feltiae* war abhängig von der Konzentration der Nematoden, der Dauer der Exposition und der Formulierung durch Zusatzstoffe.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der Mischtank als auch die Simplex 5100 Spritzanlage einschließlich aller verbauten Kreiselpumpen die Virulenz von *S. feltiae* in der Spritzbrühe nicht negativ beeinflussen.

In Freilandprüfungen wurde gezeigt, dass mit Luftfahrzeug und Simplex-Spritzanlage applizierte Nematoden ihre Virulenz nicht verlieren. Es konnte jedoch keine ausreichende Wirkung der *S. feltiae* gegen EPS in Eichenkronen gezeigt werden.

Die Auswahl der SJ7-Düse erfolgte unter dem Gesichtspunkt, dass die entstehenden Tropfen sehr große Durchmesser aufweisen und damit in der Lage sind Nematoden aufzunehmen. Große Tropfen liefern die für das Überleben der Nematoden notwendige Feuchtigkeit über eine längere Zeit. Ein Nachteil großer Tropfen ist ihre höhere Masse, die beim freien Fall der Suspension und Aufprall auf Raupen oder Teile der Baumkrone als kinetische Energie wirkt. Je höher das Tropfengewicht, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass Suspension und die darin enthaltenen *S. feltiae* nicht am Ziel anhaften und Nematoden nicht zur Wirkung kommen können. Es ist zu klären, ob Düsentypen mit geringerem Durchlass eingesetzt werden können (vgl. Brusselman *et al.* 2012), um den Wirkungsgrad von Behandlungen zu verbessern.

Da das Verhalten ausgebrachter Suspensionstropfen nicht nur abhängig von der Tropfengröße ist, sondern auch von ihrer chemischen Zusammensetzung, werden in der Modifizierung der Formulierung der Suspension große Erfolgsaussichten gesehen. Der von der Firma e-nema zur Verfügung gestellte Formulierungszusatzstoff (SPF) beruht auf einem ausgewogenen Verhältnis von Netz- und Verdickungsmitteln, die insbesondere Ansprüche des Nematoden und seiner Wirksamkeit bei Ausbringungen mit Bodengeräten erfüllen, aber nicht für die Ausbringung mit Luftfahrzeugen entwickelt wurden. Die bisherigen Freilandprüfungen lieferten keinen Aufschluss über die Eignung des Formulierungszusatzstoffes für die besonderen Anforderungen der Applikation mit einem Luftfahrzeug. Es sollte daher im Rahmen von Folgeforschungen geprüft werden, ob mit einer angepassten Formulierung die Wirkung der virulent applizierbaren Nematoden gegen EPS im Kronenraum von Eichen verbessert werden kann.

6. Literaturverzeichnis

Abràmoff, M.D., Magalhaes, P.J., Ram, S.J., 2004. Image Processing with ImageJ. Biophotonics Int. 11, 36–42.

Arthurs, S., Heinz, K.M., Prasifka, J.R., 2004. An analysis of using entomopathogenic nematodes against above-ground pests. Bull. Entomol. Res. 94. doi: 10.1079/BER2003309

Baker, R., Caffier, D., Choiseul, J.W., De Clercq, P., Dormannsne-Simon, E., Gerowitt, B., Karadjova, O.E., Lövei, G., Lansink, A.O., Makowski, D., others, 2009. Evaluation of a pest risk analysis on *Thaumetopoea processionea* L., the oak processionary moth, prepared by the UK and extension of its scope to the EU territory (No. 1195). European Food Safety Authority.

Batalla-Carrera, L., Morton, A., García-del-Pino, F., 2013. Field efficacy against the hazelnut weevil, *Curculio nucum* and short-term persistence of entomopathogenic nematodes. Span. J. Agric. Res. 11, 1112. doi: 10.5424/sjar/2013114-4210

Beck, B., Spanoghe, P., Moens, M., Brusselman, E., Temmerman, F., Pollet, S., Nuyttens, D., 2014. Improving the biocontrol potential of *Steinernema feltiae* against *Delia radicum* through dosage, application technique and timing: Improving the biocontrol potential of *Steinernema feltiae* against *Delia radicum*. Pest Manag. Sci. 70, 841–851. doi: 10.1002/ps.3628

Belay, D., Ebssa, L., Borgemeister, C., 2005. Time and frequency of applications of entomopathogenic nematodes and their persistence for control of western flower thrips *Frankliniella occidentalis*. Nematology 7, 611–622.

Brusselman, E., 2010. Optimizing the spray application of entomopathogenic nematodes in vegetables: from spray tank to nematode deposition. Phd Thesis. Universiteit Gent, Faculty of Bioscience Engineering.

Brusselman, E., Beck, B., Pollet, S., Temmerman, F., Spanoghe, P., Moens, M., Nuyttens, D., 2012. Effect of the spray application technique on the deposition of entomopathogenic nematodes in vegetables. Pest Manag. Sci. 68, 444–453. doi:10.1002/ps.2290

Chen, S., Li, J., Han, X., Moens, M., 2003. Effect of temperature on the pathogenicity of entomopathogenic nematodes (*Steinernema* and *Heterorhabditis spp.*) to Delia radicum. BioControl 48, 713–724.

Ebssa, L., Borgemeister, C., Berndt, O., Poehling, H.-M., 2001. Impact of Entomopathogenic Nematodes on Different Soil-dwelling Stages of Western Flower Thrips, *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae), in the Laboratory and Under Semi-field Conditions. Biocontrol Sci. Technol. 11, 515–525. doi: 10.1080/09583150120067544

Fife, J.P., Derksen, R.C., Erdal Ozkan, H., Grewal, P.S., 2003. Effects of pressure differentials on the viability and infectivity of entomopathogenic nematodes. Biol. Control 27, 65–72. doi: 10.1016/S1049-9644(02)00183-4

Fife, J.P., Ozkan, H.E., Derksen, R.C., Grewal, P.S., 2007. Effects of pumping on entomopathogenic nematodes and temperature increase within a spray system. Appl. Eng. Agric. 23, 405–412.

Fransen, J.J., Landschap, A.-C., 2013. Leidraad beheersing eikenprocessierups: update 2013. Nederlandse Voedsel -en Warenautoriteit/ Alterra. URL: http://library.wur.nl/WebQuery/wurpubs/437869, abgerufen am 04.01.2017.

Georgis, R., 1990. Formulation and Application Technology, in: Gaugler, R., Kaya, H.K. (Eds.), Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, pp. 173–191.

Grewal, P.S.; Ehlers, R.-U.; Shapiro-Ilan, D.I. (Hrsg.) (2005): Nematodes as Biocontrol Agents. CABI, 528 S. http://bookshop.cabi.org/uploads/books/pdf/9780851990170/9780851990170.pdf

Gries, R., Reckziegel, A., Bogenschütz, H., Kontzog, H.-G., Schlegel, C., Francke, W., Millar, J.G., Gries, G., 2004. (Z,Z)-11,13-Hexadecadienyl acetate and (Z,E)-11,13,15-hexadecatrienyl acetate: synergistic sex pheromone components of oak processionary moth, *Thaumetopoea processionea* (Lepidoptera: Thaumetopoeidae). Chemoecology 14, 95–100. doi: 10.1007/s00049-003-0266-9

Hara, A.H., Kaya, H.K., Gaugler, R., Lebeck, L.M., Mello, C.L., 1993. Entomopathogenic nematodes for biological control of the leafminer, *Liriomyza trifolii* (Dipt.: Agromyzidae). Entomophaga 38, 359–369. doi: 10.1007/BF02374454

Helingman, S., 2010. Bestrijding Eikenprocessierups met insectparasitaire Nematoden. URL: http://www.kuppen-bomen.nl/documents/BESTRIJDING_EIKENPROCESSIERUPS_MET_INSECTPARASITAIRE_NEMATODEN.pdf, abgerufen am: 27.02.2016

Jagdale, G.B., Casey, M.L., Grewal, P.S., Lindquist, R.K., 2004. Application rate and timing, potting medium, and host plant effects on the efficacy of *Steinernema feltiae* against the fungus gnat, *Bradysia coprophila*, in floriculture. Biol. Control 29, 296–305. doi: 10.1016/S1049-9644(03)00164-6

Kaya, H.K., Joos, J.L., Falcon, L.A., Berlowitz, A., 1984. Suppression of the Codling Moth (Lepidoptera: Olethreutidae) with the Entomogenous Nematode, *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae). J. Econ. Entomol. 77, 1240–1244. doi: 10.1093/jee/77.5.1240

Lacey, L.A., Unruh, T.R., 1998. Entomopathogenic Nematodes for Control of Codling Moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae): Effect of Nematode Species, Concentration, Temperature, and Humidity. Biol. Control 13, 190–197. doi: 10.1006/bcon.1998.0658

Lacey L.A., Arthurs S.P., Unruh, T.R., Headrick, H., Fritts R. Jr. 2006. Entomopathogenic nematodes for control of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in apple and pear orchards: Effect of nematode species and seasonal temperatures, adjuvants, application equipment, and post-application irrigation. Biol. Control 37, 214–223.

Lello, E.R., Patel, M.N., Matthews, G.A., Wright, D.J., 1996. Application technology for entomopathogenic nematodes against foliar pests. Crop Prot. 15, 567–574. doi: 10.1016/0261-2194(96)00026-9

Navaneethan, T., Strauch, O., Besse, S., Bonhomme, A., Ehlers, R.-U., 2010. Influence of humidity and a surfactant-polymer-formulation on the control potential of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* against diapausing codling moth larvae (*Cydia pomonella* L.) (Lepidoptera: Tortricidae). BioControl 55, 777–788. doi: 10.1007/s10526-010-9299-5

Raats, K., 2010. Resultaten nematodenproef tegen EPR: Niet meer afhankelijk van biologische insecticide Xentari. Boomzorg 4. URL: http://www.boomzorg.nl/upload/artikelen/bz410nematodenproef.pdf.

Schroeder, P.C., Ferguson, C.S., Shelton, A.M., Wilsey, W.T., Hoffmann, M.P., Petzoldt, C., 1996. Greenhouse and Field Evaluations of Entomopathogenic Nematodes (Nematode: Heterorhabditidae and Steinernematidae) for Control of Cabbage Maggot (Diopters: Anthomyiidae) on Cabbage. J. Econ. Entomol. 89, 1109–1115.

Schroer, S. and Ehlers, R.-U., 2003. Improvement of persistence and infectivity of entomopathogenic nematodes using formulation adjuvants for foliar application against Plutella xylostella. Proceedings of the Third International Symposium on Entomopathogenic Nematodes and Symbiotic Bacteria. 4–7 September 2003. The Ohio State University, Wooster, Ohio (Abstr. Poster Code: C015).

Schroer, S., Ehlers, R.-U., 2005. Foliar application of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* for biological control of diamondback moth larvae (*Plutella xylostella*). Biol. Control 33, 81–86. doi: 10.1016/j.biocontrol.2004.12.009

Schroer, S., Yi, X., Ehlers, R.-U., 2005. Evaluation of adjuvants for foliar application of *Steinernema carpocapsae* against larvae of the diamondback moth *Plutella xylostella*. Nematology 7(1), 37-44.

Schroer, S., Ziermann, D., Ehlers, R.-U., 2005. Mode of action of a surfactant–polymer formulation to support performance of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* for control of diamondback moth larvae (*Plutella xylostella*). Biocontrol Sci. Technol. 15, 601–613. doi: 10.1080/09583150500088694

Schwenke, W. (Ed.), 1978. Schmetterlinge, in: Die Forstschädlinge Europas. Verlag Paul Parey, Hamburg und Berlin, p. 467.

Shapiro-Ilan, D. I., Gauge, D. H., Koppenhöfer, A. M., 2002. Factors affecting commercial success: case studies in cotton, turf, and citrus. in: Gaugler, R. (Ed.) Entomopathogenic Nematodology. CABI Publishing, Wallingford und New York, 333-356

Syngenta Agro GmbH, 2016. Applikationstechnik Zierpflanzen - Jeder Tropfen zählt [WWW Document]. URL: https://www.syngenta.de/file/36371/download?token=LZWivYso

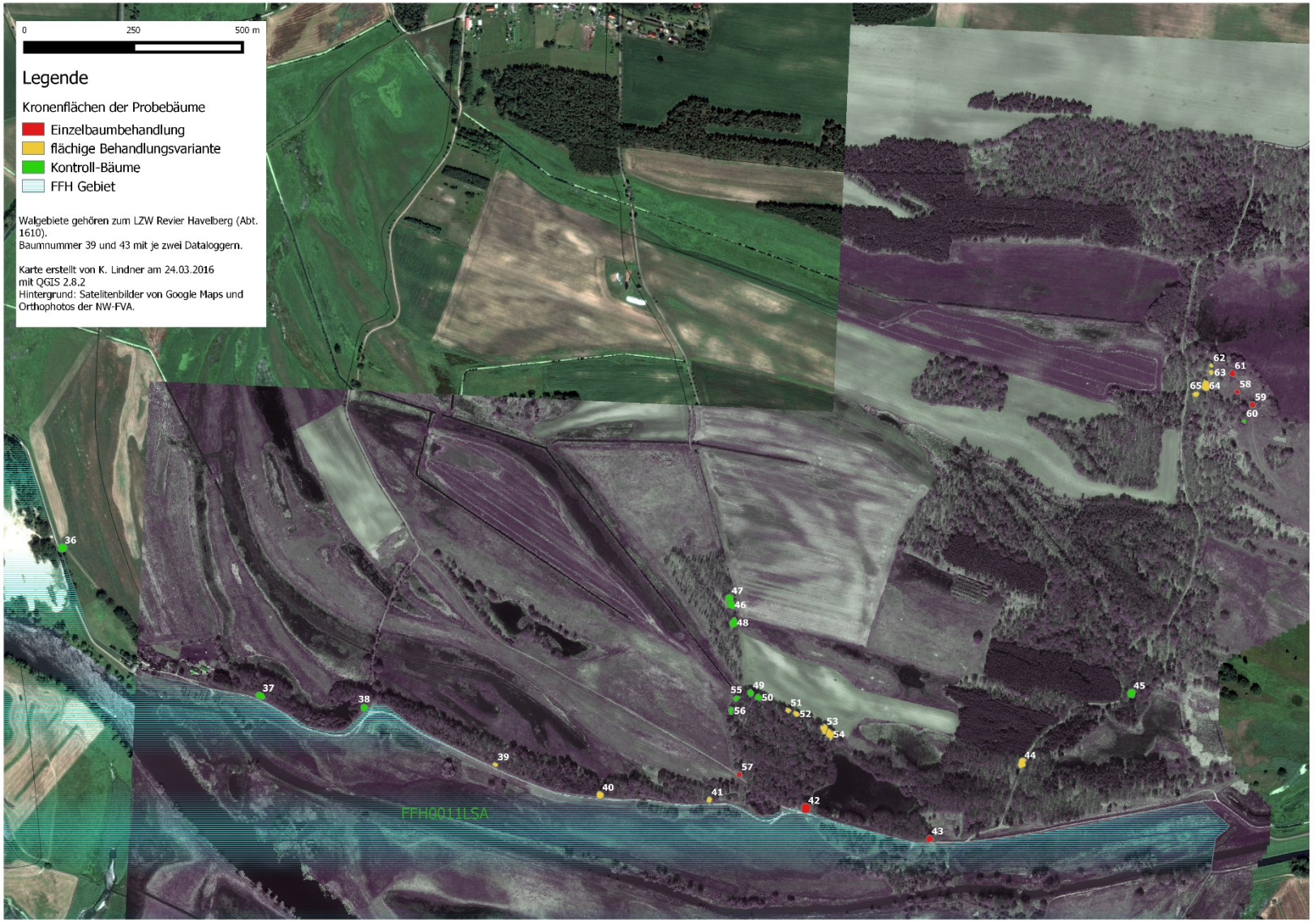
Veitinghoff, J., Schmidt, R., Kuhnke, K.-H., 2012. Erfahrungen und Beobachtungen zur Bekämpfung des Eichenprozessionsspinners an Alleen aus der Luft. Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei, Mecklenburg-Vorpommern.

Williams, D.T., Straw, N., Townsend, M., Wilkinson, A.S., Mullins, A., 2013. Monitoring oak processionary moth *Thaumetopoea processionea* L. using pheromone traps: the influence of pheromone lure source, trap design and height above the ground on capture rates. Agric. For. Entomol. 15, 126–134. doi: 10.1111/afe.12005

Williams, E.C., MacDonald, O.C., 1995. Critical factors required by the nematode *Steinernema feltiae* for the control of the leafminers *Liriomyza huidobrensis, Liriomyza bryoniae* and *Chromatomyia syngenesiae*. Ann. Appl. Biol. 127, 329–341. doi: 10.1111/j.1744-7348.1995.tb06677.x

Williams, E.C., Walters, K.F.A., 2000. Foliar Application of the Entomopathogenic Nematode *Steinernema feltiae* Against Leafminers on Vegetables. Biocontrol Sci. Technol. 10, 61–70. doi: 10.1080/09583150029396

Wright, D.J., Peters, A., Schroer, S., Fife, J.P., 2005. Application Technology, in: Grewal, P.S., Ehlers, R.-U., Shapiro-Ilan, D.I. (Eds.), Nematodes as Biocontrol Agents. CABI.



Anhang 1: Probebäume am Standort Vehlgast. Ortschaft im Kartenausschnitt oben (Norden) ist 39539 Damerow.

Anhang 2: Probebäume am Standort Wirl. Ortschaft im Kartenausschnitt links (Westen) ist 29491 Siedlung Prezelle. Ort im Kartenausschnitt unten (Süden) ist Wirl bei Prezelle.