

# Öffentlicher Schlussbericht

Von

**Geohumus GmbH**

Alt-Fechenheim 34, 60386 Frankfurt

Im Förderprogramm „Innovationen nicht-chemischer Pflanzenschutzverfahren im Gartenbau“ des BMEL

Verbundvorhaben

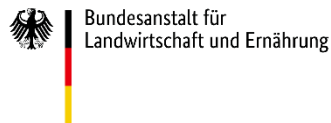
## **Entwicklung holistischer Formulierungsverfahren für den biologischen Pflanzenschutz von Beerenobst (HOPE)**

Förderkennzeichen: 2818807C19  
Berichtszeitraum: 15.04.2021 – 31.12.2024  
Veröffentlicht am: 30.10.2025  
Autor: Holger Behrens

Gefördert durch:



Projektträger



aufgrund eines Beschlusses  
des Deutschen Bundestages

Das im Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) über die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) als Projektträger des BMEL für das Förderprogramm Innovationen nicht-chemischer Pflanzenschutzverfahren im Gartenbau unterstützt. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt bei dem Autor.

## 1. Kurzbericht (Teil I)

Zur Förderung innovativer und nachhaltiger Pflanzenschutzverfahren im Gartenbau wurde vom Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft (BMEL) das Vorhaben „Entwicklung holistischer Formulierungsverfahren für den biologischen Pflanzenschutz von Beerenobst-HOPE“ gefördert (Laufzeit 04/2021-12/2024). Die Bundesanstalt für Landwirtschaft und Ernährung (BLE) betreute das Vorhaben als Projektträgerin. Die Koordination hatte die Hochschule Bielefeld (HSBI) inne.

In den letzten Jahren haben Schadinsekten wie *Drosophila suzukii* und bodenbürtige Fraßschädlinge wie der gefurchte Dickmaulrüssler und Junikäfer erhebliche Schäden in Beerenkulturen verursacht. Dies geschieht vor dem Hintergrund zunehmender Verbote chemischer Insektizide und steigender Ablehnung durch Verbraucher, was zu signifikanten Ernteausfällen führt. Die Notwendigkeit für innovative, nachhaltige Bekämpfungsstrategien ist daher nach wie vor dringlich. Das Projektziel von HOPE war ein ganzheitlicher Schutz für Beerenobst gegen Schädlinge wie *D. suzukii* und bodenbürtige Schädlinge, bei der zwei Hauptansätze verfolgt wurden:

1. **Oberirdischer Schutz:** Entwicklung einer Sprühapplikation basierend auf Virusformulierungen, die sich als wirkungsvoll gegen *D. suzukii* erweisen.

2. **Unterirdische Bekämpfung:** Einführung einer Attract-and-Kill-Strategie mit entomopathogenen Pilzen zur Schädlingsbekämpfung, kombiniert mit CO<sub>2</sub>-produzierenden Lockstoffen.

Das Projekt fokussiert sich auf nachhaltige Lösungen, die die Umwelt schonen und im konventionellen wie biologischen Anbau anwendbar sind, um Landwirten effektive Alternativen zu bieten.

Die zentralen Ergebnisse umfassten als erstes das Screening nach Viren mit Wirksamkeit gegen *D. suzukii* (AP1), welches innerhalb der vorgesehenen Zeit mit der Identifizierung zweier Viruskandidaten, DCV und LJV erreicht wurde. Die Massenvermehrung der ausgewählten Insektenpathogenen Viren wurde in der Etablierung eines robusten Kultivierungsverfahrens in Schneider S2-Zelllinien realisiert (AP2). Die Entwicklung kostengünstiger technischer Formulierungsverfahren für Insektenviren wurde auf Basis quervernetzter kationischer Polymere durchgeführt, bei der eine über mehrere Wochen formstabile Hülle für die Viren konstruiert wurde (AP3). Für die unterirdische Bekämpfung wurde die Auswahl und Anzucht entomopathogener Pilze als geeignete Kill-Komponente gegen bodenbürtiger Schädlinge abgeschlossen, bei der sich ein Isolat von *Metarhizium brunneum* als geeigneter Kandidat erwiesen hat (AP4). Für die Entwicklung einer Attract-and-Kill-Strategie wurden Umweltbedingungen die für Heidelbeerpflanzen spezifisch sind, wie niedriger Boden pH Wert und die Entwicklung eines geeigneten Granulats berücksichtigt, die wertvolle Erkenntnisse für eine optimale unterirdische Formulierung lieferte (AP5). Ein zentraler Meilenstein konnte durch die erfolgreiche orale Verfütterung und Wirksamkeit der Virenkandidaten in adulten und larvalen Stadien von *D. suzukii* erreicht werden; Infektionsversuche mit verschiedenen Pilzstämmen zeigte

Wirksamkeiten der Pilze gegenüber bodenbürtigen Schädlingen, bei der vor allem *M. brunneum* als das Isolat der Wahl zeigte, da die anderen getesteten Stämme eine geringere Sporenbildung aufwiesen (AP6). Das Projekt wurde mit praxisnahen Versuchen im Gewächshaus (GWH) und in Heidelbeerkulturen abgeschlossen (AP7). Die Skalierung von Labor- zu feldnahen Bedingungen brachte einige Herausforderungen mit sich, die dem Projektdesign geschuldet (einmaliger Praxistest im letzten Projektjahr der Virusformulierung) keine Optimierung und Implementierung der „Lessons learned“ im Folgejahr erlaubte. Es zeigte sich beispielsweise, dass der Versuchsaufbau im GWH im Hochsommer durch Austrocknung der Viruspräparate und Nahrungsquellen für die Fliegen problematisch ist.

Zusammenfassend konnte durch die enge Zusammenarbeit zwischen den verschiedenen Forschungseinrichtungen und Unternehmen vielversprechende Virusisolaten wie das Drosophila C Virus (DCV) und das La Jolla Virus (LJV) identifiziert und deren Massenproduktion erfolgreich etabliert werden. Diverse Formulierungen wurden entwickelt, um die Wirksamkeit dieser Viren zu maximieren und die Anwendung im Freiland zu ermöglichen. Zudem wurde die Interaktion zwischen entomopathogenen Pilzen und deren Implementierung für eine Attract-and-Kill Strategie untersucht, um innovative Bekämpfungsstrategien für bodenbürtige Schädlinge von Heidelbeerkulturen zu entwickeln. Die Bedeutung für die Praxis ist durch das Schadpotential der Schadinsekten nach wie vor hoch. Für den Bioanbau von Heidelbeeren ist letztjährig der Erntezeitraum von acht Wochen durch hohen *D. suzukii* Befall auf 4 Wochen halbiert worden. Der Mangel an kostengünstigen als auch nachhaltigen Kontrollmaßnahmen stellen biologische Bekämpfungsmaßnahmen nach wie vor im Rahmen eines integrierten Pflanzenschutzes in den Fokus von Forschungsbemühungen. Wissenschaftlich konnten durch dieses Projekt mehrere Publikationen und Vorstellungen auf Fachtagungen eine Sichtbarkeit erreichen.

## 2. Ausführliche Darstellung

### Ausgangslage und Ziele

Die invasive Kirschessigfliege *Drosophila suzukii* stellt eine erhebliche Herausforderung für den Obstbau dar, insbesondere im ökologischen Sektor. Anders als andere *Drosophila*-Arten befällt *D. suzukii* gesunde, reife Früchte (kurzzeitig vor der Ernte) und verursacht dadurch massive Ertragsverluste. Die besonderen biologischen Eigenschaften wie ein sägeartiger Ovipositor, schnelle Generationszyklen und hohe Reproduktionsraten ermöglichen eine rasche Populationsausbreitung. Konventionelle chemische Insektizide stoßen bei der Bekämpfung zunehmend an regulatorische, ökologische und praktische Grenzen: Rückstände in marktfähigen Früchten, die Gefährdung von Nützlingen sowie Resistenzentwicklungen schränken ihre Anwendung insbesondere im ökologischen Landbau stark ein. Der steigende gesellschaftliche und regulatorische Druck zur Reduktion chemischer Pflanzenschutzmittel unterstreicht die Dringlichkeit der Entwicklung nachhaltiger und biologischer Alternativen.

In den letzten Jahren hat sich die Forschung zur biologischen Kontrolle von *D. suzukii* intensiviert. Neben der bereits bekannten Wirksamkeit entomopathogener Pilze wie *Beauveria bassiana* und

*Metarhizium brunneum* im Labor (z. B. in Form von beimpften Beeren oder verkapselten Formulierungen), werden zunehmend neue biologische Bekämpfungsstrategien untersucht. Eine der vielversprechendsten Entwicklungen ist der gezielte Einsatz natürlicher Gegenspieler wie Parasitoiden. Besonders hervorzuheben ist *Ganaspis cf. brasiliensis*, ein parasitoider Hymenopter aus Asien, der sich durch seine hohe Wirtsspezifität gegenüber *D. suzukii* auszeichnet. Im Gegensatz zu vielen einheimischen Parasitoiden, die auch andere Drosophiliden befallen, parasitiert *G. cf. brasiliensis* nahezu ausschließlich *D. suzukii*-Larven in frischem Fruchtgewebe. Aufgrund dieser Spezifität wurde die Art bereits in der Schweiz, Frankreich, Italien und den USA im Rahmen kontrollierter biologischer Freisetzungsprogramme eingeführt. Auch *Trichopria anastrephae* zeigt Potenzial, insbesondere im Puppenstadium der Fliege. Beide Arten bieten ein hohes Maß an Biosicherheit und könnten mittelfristig eine dauerhafte Etablierung in betroffenen Regionen ermöglichen. Parallel dazu wurde die Sterile Insektentechnik (SIT) zur gezielten Populationskontrolle von *D. suzukii* weiterentwickelt. Anders als bei früheren Ansätzen, bei denen genetisch modifizierte Organismen (GVO) zum Einsatz kamen, ermöglicht der Einsatz von Röntgenstrahlung zur Sterilisation männlicher Fliegen eine effektive Methode ohne Eingriffe ins Genom. Diese Technik erfüllt daher regulatorische Anforderungen in der EU und anderen Regionen. Erste Freisetzungsversuche in geschlossenen Produktionssystemen zeigen vielversprechende Ergebnisse, insbesondere in Kombination mit Lockstofffallen.

Ein weiterer innovativer Ansatz nutzt organische Reststoffe: Aus Orangenschalen gewonnene, fermentierte Extrakte – das sogenannte „Salty Orange Peel Product (OPP)“ – haben sich in Labor- und Gewächshausversuchen als hochattraktiv für *D. suzukii* erwiesen. Sie übertrafen in Lockwirkung teilweise kommerzielle Produkte. Gleichzeitig konnte eine signifikante Reduktion der Eiablage und Larvenanzahl in behandelten Früchten erzielt werden. Dieser biobasierte und umweltfreundliche Wirkstoff zeigt das Potenzial, sowohl als Lockstoff als auch direkt Insektizid zu wirken – ein doppelter Vorteil in der biologischen Schädlingskontrolle.

Diese Entwicklungen ergänzen die bestehenden Strategien zur Nutzung entomopathogener Pilze, Nematoden oder Formulierungen in polymeren Kapselsystemen. Letztere ermöglichen die gezielte Freisetzung und Vermehrung von Wirkorganismen im Boden oder an den Kulturpflanzen und gewinnen angesichts herausfordernder Umweltbedingungen (z. B. niedriger pH-Wert im Heidelbeeranbau) weiter an Bedeutung.

### **Zielsetzungen des Projekts**

Das Projekt HOPE verfolgt das Ziel, eine innovative, biologisch wirksame und praxistaugliche Formulierung gegen i) bodenbürtige und ii) fruchtebefallende Schadinsekten wie *D. suzukii*, *Otiorhynchus sulcatus* und Engerlinge zu entwickeln und damit einen holistischen Schutz für Beerenobst zu gewährleisten. Der Fokus bei i) liegt auf der Entwicklung eines verkapselten mikrobiellen Produkts (basierend auf einem insektenparasitierenden Pilz), das unter den spezifischen Bedingungen des Heidelbeeranbaus einsetzbar ist – also unter sauren Bodenverhältnissen und begrenzter Bodenfeuchte. Neben der Erhöhung der Wirksamkeit und

Umweltstabilität sollen auch Anforderungen an Lagerfähigkeit und Applikationsfreundlichkeit erfüllt werden. Hinsichtlich ii) liegt der Fokus auf einer Sprühformulierung, die spezifisch *D. suzukii* kontrollieren soll und ebenfalls die spezifischen Umweltbedingungen adressiert.

HOPE kombiniert mehrere innovative Ansätze die folgenden Nutzen erwarten lassen:

- **Technologische Innovation:** Entwicklung eines mikrobiellen Bioinsektenmittels mit aktiven Lockstoffen in einer pH-stabilen Verkapselung, die die gezielte Wirkung im Boden ermöglicht. Entwicklung einer Virusformulierung die gezielt Wirkung an den Früchten ermöglicht.
- **Biologische Innovation:** Nutzung synergistischer Effekte zwischen Lockstoffen (z. B. CO<sub>2</sub> aus Hefe) und entomopathogenen Pilzen.
- **Umwelt- und Marktinnovation:** Bereitstellung einer nachhaltigen, rückstandsfreien Alternative zu chemischen Insektiziden mit hoher Verbraucher- und Umweltakzeptanz.
- **Regulatorisches Potential:** Durch Verzicht auf GVO und synthetische Wirkstoffe hohe Chancen auf Zulassung im ökologischen Landbau.

Der erwartete Nutzen umfasst eine signifikante Reduktion des Befallsdrucks bei gleichzeitig hoher Umweltverträglichkeit und Anwendungssicherheit. Durch die Formulierung in einem langzeitstabilen System können Lagerung und Applikation durch Landwirte deutlich vereinfacht werden, was die Praxisnähe und Marktchancen erheblich steigert. Durch bekannte Darreichungsformen (Kapsel, Sprühformulierung) soll zusätzlich die Akzeptanz der Endanwender adressiert werden.

### 3. Projektverlauf und Methodik

#### Arbeitspakete und Zeitplan

Das Projekt HOPE gliedert sich in sieben aufeinander abgestimmte Arbeitspakete (AP1–AP7), die in zwei Phasen unterteilt und über die Projektlaufzeit hinweg sukzessive oder parallel bearbeitet wurden. Die Planung sah eine initiale Laufzeit von drei Jahren vor (01/2021–12/2023). Aufgrund personeller Engpässe, insbesondere durch unerwartete Personalwechsel bei mehreren Projektpartnern, wurde das Projekt jedoch um sechs Monate bis Mitte 2024 verlängert. Die Projektstruktur blieb weitgehend erhalten; einzelne Aktivitäten verschoben sich jedoch zeitlich.

#### Übersicht über die Arbeitspakete:

**AP1 – Screening nach Viren gegen *D. suzukii* (IME):** In der Anfangsphase wurden potenziell wirksame insektenpathogene Viren identifiziert, die spezifisch gegen *D. suzukii* wirken. Das Screening diente der Selektion hoch virulenter Isolate als Grundlage für weitere Entwicklungen.

**AP2 – Massenvermehrung ausgewählter Viren (THM, IME, BIO):** In zwei Unterpaketen wurden neue Kultivierungsverfahren für die Massenvermehrung der Viren entwickelt (AP2.1).

**AP3 – Entwicklung von Formulierungsverfahren für Insektenviren (FHB, BIO):** Neben der Entwicklung

stabiler, sprühfähiger Formulierungen (AP3.1) stand hier die Prozessüberführung in eine praxistaugliche Pilotproduktion (AP3.2) im Fokus. Die Formulierungen sollten Lager- und UV-stabil sein und eine hohe biologische Wirksamkeit erhalten. **AP4 – Auswahl und Anzucht entomopathogener Pilze (IME, FHB, BIO):** Parallel zur Virenentwicklung wurden endomykotische Pilze (z. B. *Metarhizium brunneum*, *Beauveria bassiana*) als zusätzliche Kill-Komponenten untersucht, insbesondere gegen bodenbürtige Schadinsekten. **AP5 – Entwicklung einer Attract-and-Kill-Strategie mit Pilzen (FHB, GEO, BIO):** Die Integration von Lockstoffen und Mikroverkapselungen in innovative Formulierungen wurde hier umgesetzt. **AP6 – Wirksamkeitstests (IME, WIN):** In Laborstudien und Topfversuchen wurde die Effektivität der entwickelten Virus- und Pilzformulierungen gegen *D. suzukii* (AP6.1) sowie gegen bodenbürtige Schadinsekten (AP6.2) untersucht. Diese Tests bildeten die Grundlage für die Auswahl geeigneter Kandidaten für die Freilandversuche. **AP7 – Praxisnahe Versuche (alle Partner):** Im letzten Projektabschnitt wurden erfolgversprechende Formulierungen aus AP3 und AP5 in Versuchen unter praxisnahen Bedingungen (Gewächshaus, Freiland) auf dem Gut Winkelmann vor Ort getestet.

### **Zeitliche Umsetzung und Anpassungen**

Der ursprüngliche Gantt-Plan sah eine klare Staffelung der Arbeitspakete mit mehreren Meilensteinen vor. Aufgrund von Verzögerungen (v. a. durch Personalwechsel und pandemiebedingte Engpässe) wurde die Projektlaufzeit um sechs Monate verlängert. Die wichtigsten Auswirkungen: Der Abschluss der Screening- und Formulierungsphase (AP1–AP5) verschob sich von Ende 2022 bis 2024. Die praxisnahen Versuche (AP7), ursprünglich für 2023 geplant, wurden im erweiterten Projektzeitraum 2024 abgeschlossen. Die Meilensteine M4 (Auswahl der finalen Formulierungen) und M5 (Nachweis der Wirksamkeit im Freiland) wurden nur teilweise erreicht, jedoch zeitlich angepasst.

### **Übersicht über die Meilensteine**

**Meilenstein 1 (Q2/2022):** Identifikation eines hoch virulenten Virus-Isolats gegen *D. suzukii* sowie eines wirksamen Pilzisolats gegen bodenbürtige Schädlinge im Labormaßstab. **Meilenstein 2 (Q3/2022):** Entwicklung einer sprühfähigen Virusformulierung zur Überführung ins Scale-up. **Meilenstein 3 (Q4/2022):** Auswahl geeigneter Materialien und Verfahren zur Herstellung von Granulaten/Kapseln auf Pilzbasis. **Meilenstein 4 (Q3/2023):** Auswahl wirksamer Formulierungen für praxisnahe Freilandversuche. **Meilenstein 5 (Q1/2024):** Nachweis der Wirksamkeit beider Formulierungen unter Freilandbedingungen.

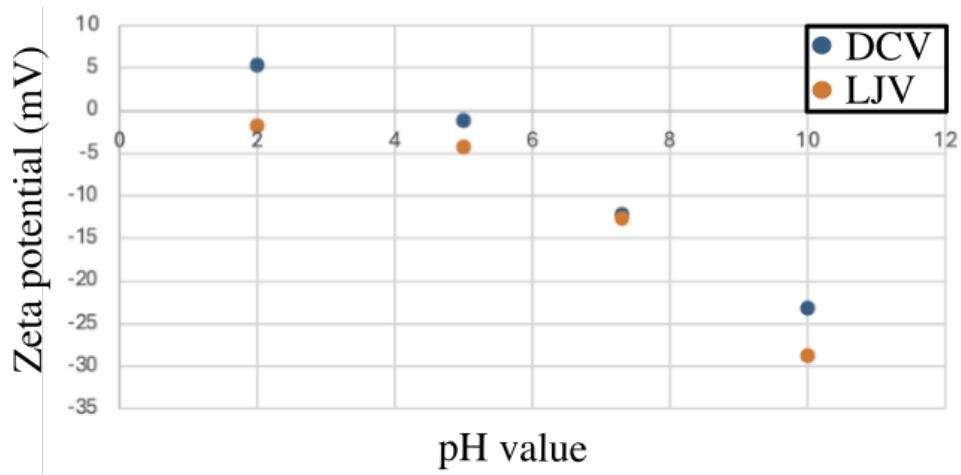
## **4. Ergebnisse**

### **AP3 Entwicklung einer Virusformulierung**

Übergeordnetes Ziel des AP3 ist die Entwicklung einer stabilen Virusformulierung, die optimal an den Heidelbeerpflanzen haften und spreiten und somit effektiv *D. suzukii* kontrollieren kann. Nach eingehendem Screening von möglichen Materialien, die die Virusformulierung konstituieren

sollen, fiel die Wahl auf das kationische Biopolymer Chitosan, welches mit Tripolyphosphat (TPP), quervernetzt wurde. Der Auswahl dieser Materialien ist darin begründet, dass ein kostengünstiges kationisches Biopolymer benötigt wird, um die Oberflächenladung der LJV- und DCV Viren zu maskieren. Verdeutlicht wird dies durch das Zeta-Potentials beider Viren.

Abbildung 1: Darstellung des Zetapotentials (Oberflächenladung) in Abhängigkeit vom pH-Wert der unformulierten DC- und LJ Viren.



Wie aus Abbildung 1 hervorgeht, weisen beide Viren ein ähnliches Zetapotential bei entsprechenden pH-Werten auf. Entscheidend ist, dass bei physiologisch relevanten pH-Werten negative Zetapotentiale vorliegen. Besonders im Posterior Midgut (Abb.2) von *D. suzukii*, (pH~ 10) wo das Virus aus der Formulierung freigesetzt werden soll, liegt ein deutlich negatives Zetapotential vor. Deutlich wird an Abb.1 ebenfalls, dass das verwendete kationische Biopolymer (Chitosan) bei pH 10 idealerweise von dem entsprechenden Virus abgelöst wird, um eine Freisetzung zu gewährleisten. Dies ist beim Chitosan ebenfalls der Fall, da die Aminogruppen bei pH 10 überwiegend in ihrer Neutralform vorliegen und wenig elektrostatische Wechselwirkungen zum Virus aufweisen. Mit den Aspekten der Ladung, Kosten und Release verhalten ist die Wahl des Biopolymers gut begründet.

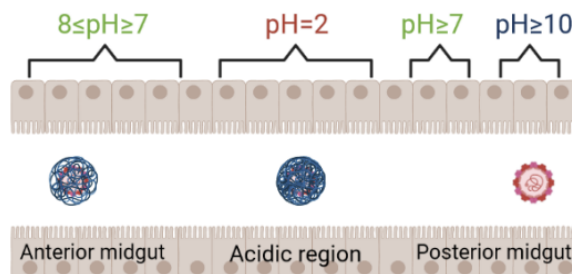


Abbildung 2: Verlauf der pH-Werts vom Mitteldarm bis zum Enddarm bei *D. suzukii*.

Daher wurde im AP3 das Biopolymer Chitosan näher auf dessen Formulierungseigenschaften, besonders im Zusammenspiel mit TPP untersucht. Besondere Relevanz für die Virusformulierung haben die finalen Partikelgrößen der Formulierung und deren Zetapotential, die Formulierungseffizienz, sowie die Release Kinetik. Die Bedeutung der finalen Partikelgröße liegt darin begründet, dass die Partikel den Rüsseldurchmesser von *D. suzukii* (ca. 10 Mikrometer) unterschreiten müssen. Daher wurden in AP3 zunächst Einflussfaktoren ermittelt, die den Partikeldurchmesser beeinflussen können. Die relevanten Einflussfaktoren sind: die Kettenlänge des Chitosans, das Verhältnis von Chitosan zu TPP, der Salzgehalt, die Konzentration der eingesetzten Materialien und die Rührgeschwindigkeit. Beachtenswert ist, dass das experimentelle Vorgehen einen entscheidenden Einfluss auf die entstehenden Partikel hat. Das wesentliche Vorgehen der Formulierung ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

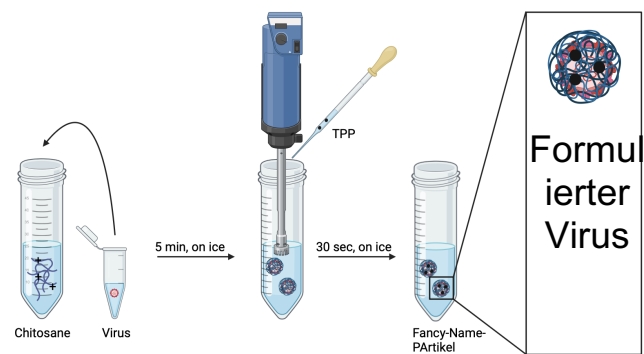


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Formulierungsansatzes bei dem das entsprechende Virus (DCV, LJV) zunächst mit Chitosan versetzt und anschließend mit TPP quervernetzt wird.

Hinsichtlich der Größe der Partikel, lässt sich festhalten, dass bei dem verwendeten Verhältnis (4:1) von Chitosan zu TPP und der Konzentration von x Mol bei 8000 rpm Partikel entstehen, die einen Durchmesser von durchschnittlich 7.6  $\mu\text{m}$  aufweisen (Abbildung 3-4).

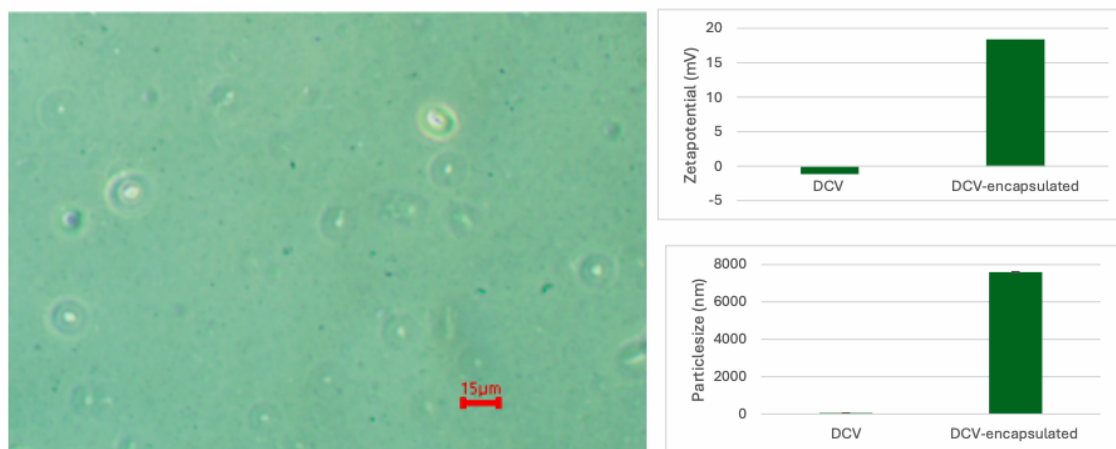


Abbildung 4: Optische Mikroskopie Aufnahme der formulierten DCV Viren. Dargestellt ist darüber hinaus der Partikeldurchmesser, ermittelt am Mastersizer und das dazugehörige Zetapotential für die unformulierten (DCV) und formulierten (DCV-encapsulated) Viren bei pH = 5.

In Abbildung 4 ist ersichtlich, dass bei der verwendeter Formulierungsmethode die Oberflächenladung des DCV Virus maskiert wird und das Virus in Partikel eingebettet wird. Die Partikel entstehen aufgrund von Coulomb-Wechselwirkungen zwischen den negativen Ladungen auf der Virushülle und dem positiv geladenen Chitosan (pH:5). Die Zugabe des TPP verursacht eine Quervernetzung des Chitosans; das bedeutet, dass aus einem linearen Makromolekül ein dreidimensional vernetztes Polymernetzwerk entsteht. Dieses soll verbesserten Schutz gegen biotische und abiotische Stressoren gewährleisten. Um das Vorgehen (Rühren während der Quervernetzung) besser rationalisieren zu können und den Einfluss der verwendeten Chemikalien (Chitosan, TPP) auf die Formulierung zu untersuchen, wurden Proben i) mit Chitosan unterschiedlichen Molekulargewichts, ii) einem unterschiedlichen Verhältnis von Chitosan:TPP und iii) unterschiedlicher Rührgeschwindigkeit hergestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 zusammengefasst. Deutlich erkennbar ist, dass mit steigendem Molekulargewicht die Partikelgrößen zunehmen und die Formulierungseffizienz abnimmt. Weiterhin nimmt die Partikelgröße bei einem höheren Chitosangehalt zu, aber bei höherer Rührgeschwindigkeit ab.

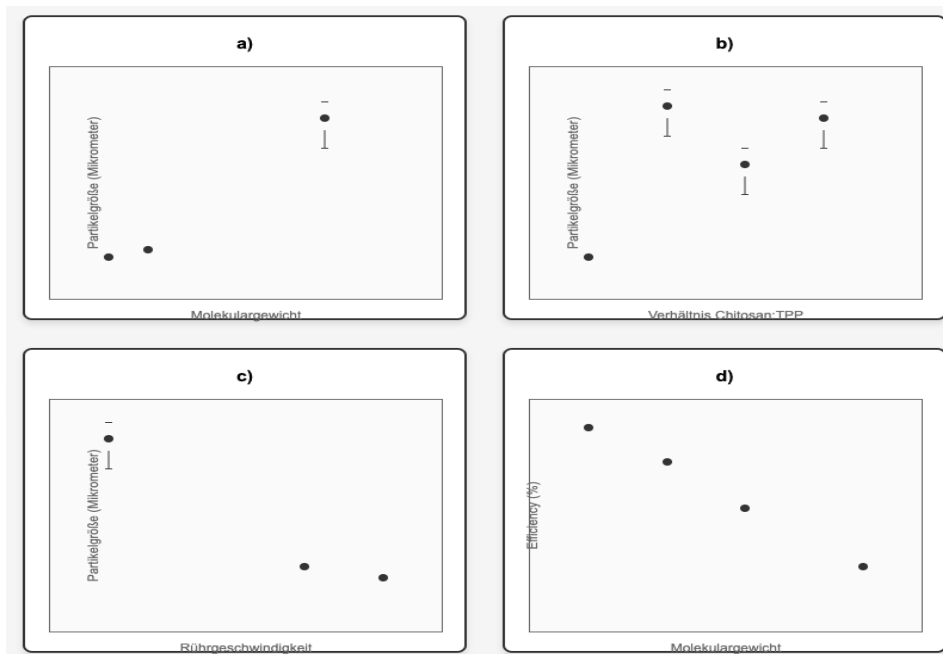


Abbildung 5: a) Auftragung der Partikelgröße in Abhängigkeit vom Molekulargewicht des Chitosans. b) Darstellung der Partikelgröße in Abhängigkeit vom Chitosan:TPP Verhältnis. c) Einfluss der Rührgeschwindigkeit auf die Partikelgröße und d) Auftragung der Formulierungseffizienz (EE) in Abhängigkeit vom Molekulargewichts des Chitosans für DCV.

Die wesentlichen Erkenntnisse über die verwendeten Formulierungsmethode (Edukte, Rührgeschwindigkeit) sind in Abbildung 5 zusammengefasst. Bemerkenswert ist, dass ein Chitosan mit niedrigem Molekulargewicht (ultra low) benötigt wird, um relativ kleine Partikel zu erzeugen, die zusätzlich eine hohe Verkapselungseffizienz (Abb. 5d) aufweisen. Diese ist notwendig, damit eine hohe Anzahl an Viren verkapselt vorliegen.

Diese Ergebnisse lassen sich zunächst so interpretieren, dass ein kurzkettiges Chitosan besser dazu in der Lage ist, an die negativen Oberflächenladungen des entsprechenden Virus anzulagern. Damit steigt die Verkapslungseffizienz bei kurzkettigen Chitosanen. Weiter wird in Abb. 5 deutlich, dass eine sehr hohe Rührgeschwindigkeit (und damit auch ein hoher Energieeintrag) benötigt wird, um kleine Partikel zu erzeugen. Diese Beobachtung lässt sich damit erklären, dass bei niedrigen Rührgeschwindigkeiten das TPP stetig Chitosan untereinander quervernetzt und somit wenige, dafür aber große Polymernetzwerke entstehen (im Extremfall ein einziges vernetztes Makromolekül). Bekannt ist jedoch, dass große Partikel (größer 10  $\mu\text{m}$ ) eine schlechte Verkapslungseffizienz aufweisen und nicht von *D. suzukii* aufgenommen werden können. Bei hohen Scherkräften (durch schnelles Rühren) kann sich dieses makroskopische Netzwerk nicht ohne weiteres ausbilden, sodass kleinere Polymernetzwerke entstehen, die besser dazu in der Lage sind, die Viren zu umhüllen.

Weiter wurde als zusätzlicher Einflussfaktor auf die Virusformulierung, die ionische Stärke (ionic strength), das bedeutet, die Konzentration an vorliegenden Ionen evaluiert. Die Relevanz dieser Größe ist darin begründet, dass auf der Blattoberfläche eine eher niedrige Ionenkonzentration vorliegt, im Darm von *D. suzukii* jedoch eine deutlich höhere Ionenkonzentration (50-200 mM). Entscheidend ist daher, dass die Partikel auf der Blattoberfläche (bei kleiner ionic strength) weiterhin als kleine Partikel vorliegen, damit diese von *D. suzukii* aufgenommen werden können. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 zusammengefasst. In dieser Versuchsreihe wurde die Konzentration an  $\text{MgCl}_2$  (als Salz) systematisch bis zur Äquimolarität (zur Formulierung) erhöht.

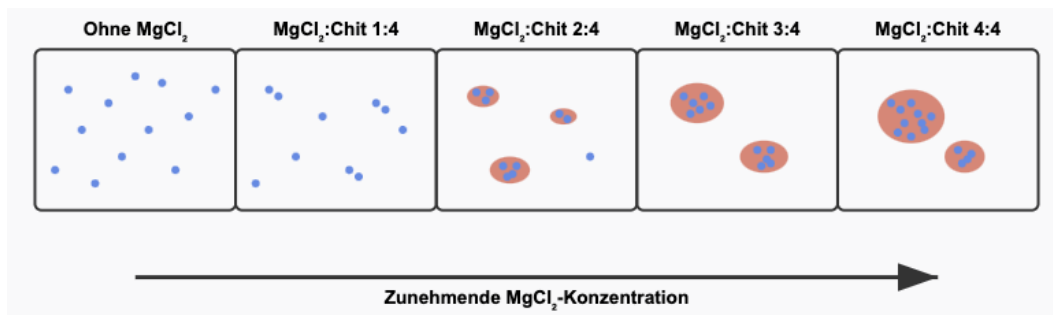


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Einflusses der Variation der  $\text{MgCl}_2$  Konzentration auf die Virusformulierung.

Ersichtlich ist, dass bei Abwesenheit des Salzes, sowie bei Salzkonzentrationen bis hin zu  $\frac{1}{4}$  der eingesetzten Chitosankonzentration keine signifikante Veränderung der Partikelgröße zu beobachten ist. Bei hohen Salzgehalten und damit auch hoher ionic strength ( $\frac{1}{2}$  der eingesetzten Chitosan Konzentration) lässt sich eine zunehmende Agglomeration der Partikel beobachten. Dies hängt damit zusammen, dass die Oberflächenladung (Zetapotential) der Formulierung mit steigender ionic strength zunehmend neutral wird, da sich die Chlorid-Anionen an die positiv geladene Oberfläche anlagern. Neutral geladene Partikel sind dafür bekannt, dass diese über schwache Wechselwirkungen zu größeren Partikelverbänden agglomerieren. Von Bedeutung ist jedoch, dass keine nennenswerten Größenänderungen bei physiologisch relevanten (max. 1:4) Ionenstärken auftreten.

Als weiterer Aspekt zur Beeinflussung der physikochemischen Eigenschaften (vornehmlich der Partikelgröße) wurde eine nm-kleine Virusformulierung erarbeitet. Beobachtet wurde bislang, dass im 'best case' die Virusformulierung kolloidale Partikel mit einem Durchmesser von knapp 8  $\mu\text{m}$  aufweisen. Die wesentliche Idee, die verfolgt wurde, war die ursprüngliche Konzentration an Edukten, um den Faktor 100 auf 1 mMol zu verdünnen. Dabei wurde der bereits oben beschriebene Netzwerkeffekt weiter minimiert, sodass final 1-2 Viren von einer nm dünnen Schicht (im nm Bereich) aus Chitosan und TPP umhüllt sind. Dies wurde mithilfe von Rasterelektronenmikroskopieaufnahmen bestätigt. Eine schematische Darstellung ist in Abb. 7 abgebildet.

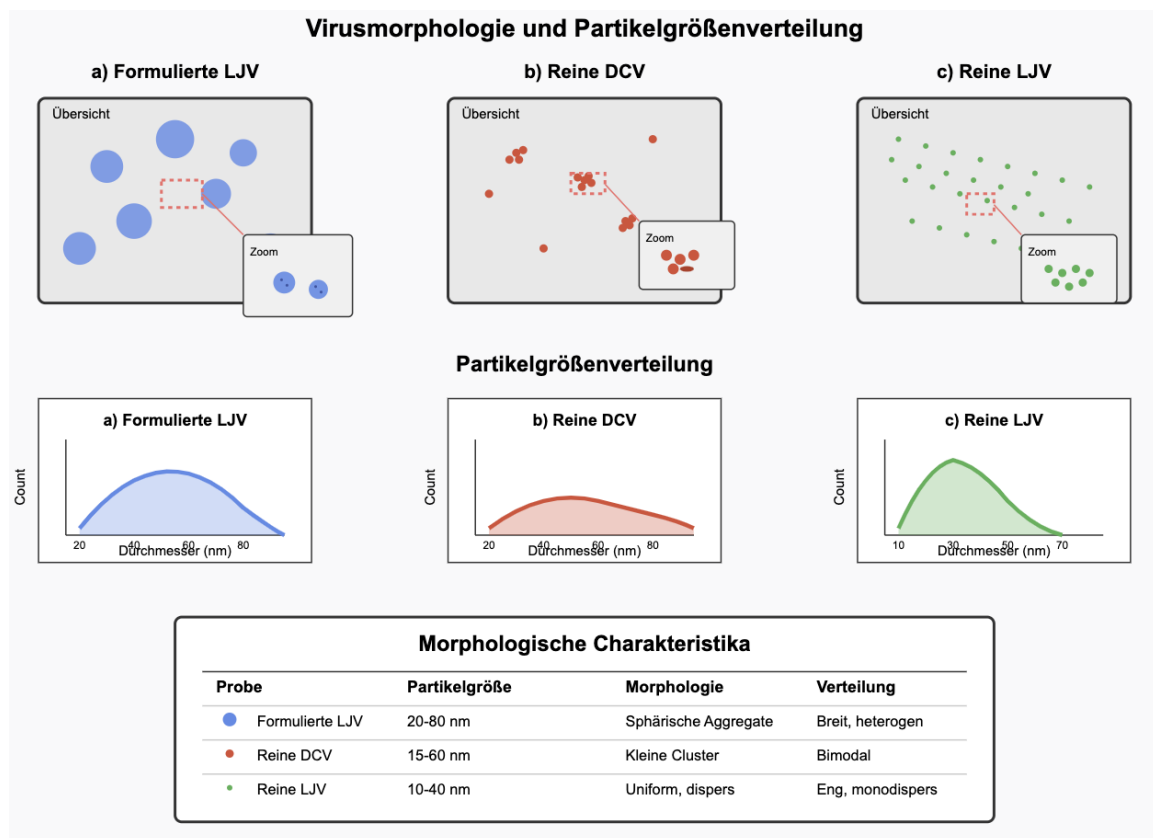


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Ergebnisse der Rasterelektronenmikroskopie an a) formulierten LJV Viren, b) reinen DCV und c) reinen LJV. Statistische Größenverteilungen sind für alle drei Proben dargestellt.

Aus der schematischen Darstellung (Rasterelektronenmikroskopie) in Abbildung 7 lassen sich zunächst die primären Virusgrößen ermitteln. Bemerkenswert ist, dass das DCV und LJV Virus näherungsweise ähnliche Größen von 30-45 nm aufweisen. Erkennbar ist zudem deutlich, dass die Virusformulierung größere Partikel von c. 30-55 nm beinhaltet. Diese Partikel bieten also theoretisch Platz für 1-2 Viren. Insgesamt lässt sich aus Abb. 7 ableiten, dass der Einfluss der Verdünnung um den Faktor 100 dazu geführt hat, dass wenige nm kleine verkapselte Viruspartikel entstehen. Anders, als bei hohen Polymerkonzentrationen, die zu einer teilweisen oder vollständigen Vernetzung führen, ist mit diesem Ansatz erstmals eine echte

Einzelvirusverkapselung für LJV und DCV gelungen. Weiter stellt sich die Frage, ob die Formulierung auch dazu in der Lage ist, das Virus am Ort der Wirkung zu releasen. Da der release im posterior midgut ablaufen soll, muss der alkalische pH Wert (<10) des posterior midgut für den release berücksichtigt werden. Die Formulierung wurde in einem simulierten posterior midgut mit einem pH von 10 überführt. Anschließend wurden Proben aus dem Überstand zu unterschiedlichen Zeitpunkten gezogen, um die release Kinetik mittels qPCR nachzuvollziehen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.

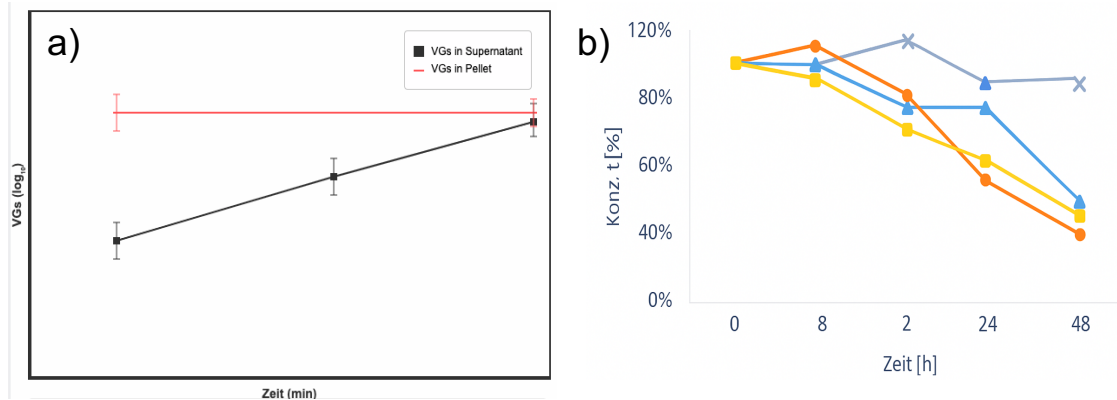


Abbildung 8: a) Schematische Darstellung der release Kinetik gemessen mittels qPCR. b) qPCR Ergebnisse vor und nach UV-Einstrahlung (1, 8, 24 und 48 h) für den DCV Virus (blaue Linie), die Virusformulierung ohne UV Schutzmittel (orange Linie) und Melasse (gelbe Linie) als UV Schutzmittel.

DCV Virus aus der Formulierung (Chitosan-TPP), Melasse (gelbe Linie) und Titandioxid (graue Linie) als UV Schutzmittel.

Aus Abbildung 8a) geht hervor, dass die Viruskonzentration im Überstand bereits nach kurzer Zeit der Referenzkonzentration (ursprünglich Eingesetzte Virusmenge) entspricht und damit von einem vollständigen DCV release auszugehen ist. Das entscheidende hierbei ist, dass dieser release bei pH 10 festgestellt wurde und dass im neutralen bis sauren pH Bereich (unterhalb 7) kein release beobachtet wurde. Neben den physikochemischen Eigenschaften der Virusformulierung wurde ferner nach geeigneten Zusatzstoffen gesucht, die i) die UV-Beständigkeit verbessern und ii) ein Spreizen und Haften der Virusformulierung ermöglichen. Hinsichtlich der Verbesserung der UV-Beständigkeit wurden zwei unterschiedliche Adjuvantien auf ihre Eignung hin untersucht, nämlich das bekannte UV-Schutzmittel TiO<sub>2</sub> und Melasse als bio-basiertes Adjuvans. Als Referenzproben wurden unbehandeltes DCV und formuliertes DCV verwendet. Die vier unterschiedlichen Proben wurden mit UVA/UVB Strahlung (20 W) über unterschiedlich lange Zeiträume bestrahlt. Anschließend wurde mittels qPCR die Viruskonzentration bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8b) zusammengefasst.

Aus Abbildung 8b) geht hervor, dass lediglich die Formulierung B, die 1 % TiO<sub>2</sub> enthält, einen deutlichen UV Schutz über längere Zeiträume gewährleistet. Sowohl der unformuliertes DCV, formuliertes DCV, als auch die ökologische Alternative in Formulierung C (Melasse als UV Schutz) zeigten einen deutlichen UV-Abbau, der bereits nach 8 h einen 20%-igen Abbau aufweist. In

diesem Versuch zeigt sich, dass die ursprünglich angedachte ökologische UV-Schutz-Alternative hinsichtlich ihrer Schutzwirkung im Vergleich zu den klassischen anorganischen Metalloxiden ( $\text{TiO}_2$ ) deutlich unterlegen ist. Problematisch bei Formulierung B sind die zytotoxischen Eigenschaften des  $\text{TiO}_2$ , die bei oraler Aufnahme auftreten, weshalb diese Formulierung nicht in die Praxis transferiert werden kann.

Ferner sollte im Rahmen der Entwicklung einer Virus Sprühformulierung ein Benetzungs- und Haftmittel vorhanden sein, welches dafür sorgt, dass sich die formulierten Virus Partikel gleichförmig auf den Blättern und Beeren verteilen können und nicht direkt von den Blättern/Beeren abperlen. Hierfür wurden zwei Adjuvantien ausgewählt, nämlich Tween 80 und Heliosol. Bei Heliosol handelt es sich um ein nicht-ionisches Adjuvans auf Basis natürlicher Kiefern-Terpene, welches ein kommerziell erhältliches Mittel im Pflanzenschutz darstellt. Tween 80 stellt ebenfalls ein nicht-ionisches Tensid dar, welches aus Sorbit, Oleinsäure und Ethylenglykolen hergestellt wird. Erwähnenswert ist, dass Heliosol im Ökolandbau zugelassen ist, wobei Tween 80 nur eingeschränkt zugelassen ist.

Die beiden Adjuvantien wurden auf ihre i) Haftwirkung ii) Spreizwirkung und iii) Toxizität gegenüber der Heidelbeerpflanze und Insekten getestet. Wünschenswert sind Adjuvantien, die eine gute Spreizwirkung bei bereits niedrigen Konzentrationen, eine geringe Toxizität und eine mittlere Adhäsionsarbeit (Haftwirkung) aufweisen. Die Resultate der Adjuvans Untersuchungen sind in Abbildung 9-10 dargestellt.

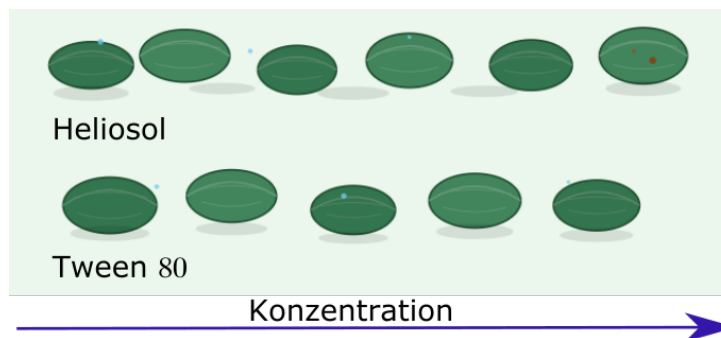


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Toxizitätstests von Heliosol und Tween 80 an Heidelbeerblättern. Die verwendeten Massenkonzentrationen der beiden Adjuvantien sind von links nach rechts ansteigend 0.01 %, 0.05 %, 0.1 %, 0.5 %, 1 % und 5 %.

Aus den Abbildungen 9 und 10 gehen wertvolle Erkenntnisse hinsichtlich der zu verwendenden Adjuvans Konzentration hervor. Zunächst fällt bei den visuellen Blatt-Toxikologischen Tests (Abbildung 9) auf, dass die Heidelbeerblätter über einen weiten Konzentrationsbereich keine Nekrosen bilden. Weiter ist in Abbildung 9 erkennbar, dass Heliosol und Tween-80 keine signifikanten Unterschiede über einen weiten Konzentrationsbereich aufzeigen. Lediglich bei hohen Konzentrationen (praxisunüblich) (5 %) zeigten sich vereinzelt Nekrosen an den Heidelbeerblättern, die durch Heliosol verursacht wurden. Zudem wird in Abb.10 deutlich, dass beide Adjuvantien bei gleicher Konzentration vergleichbare Spreizeigenschaften (Kontaktwinkel)

aufweisen. Hinsichtlich der Adhäsionsarbeit (W) (Haftigenschaften auf Blattoberfläche) lassen sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen Heliosol und Tween 80 feststellen.

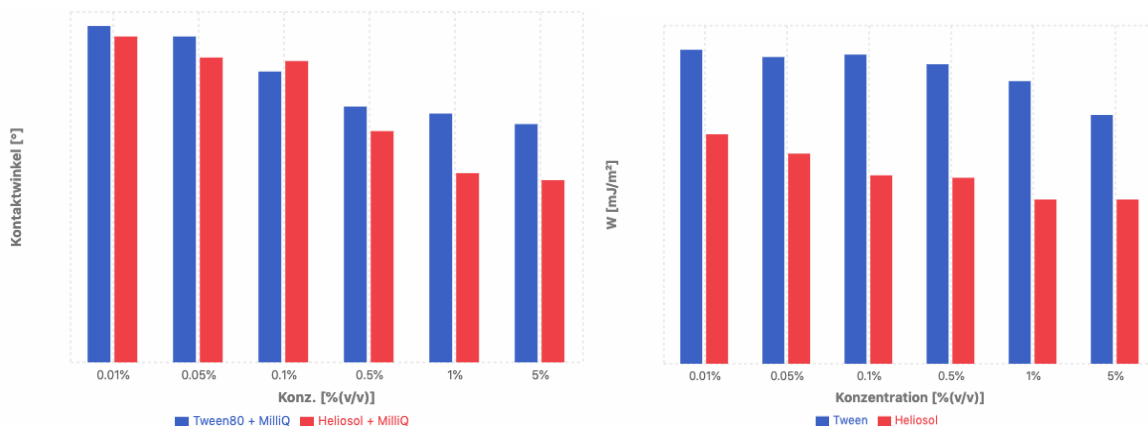


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Kontaktwinkels und der Adhäsionsarbeit von Tween 80 und Heliosol für 0.01 %, 0.05 %, 0.1 %, 0.5 %, 1 % und 5 %.

Erkennbar über den gesamten Konzentrationsbereich ist die deutlich höhere Adhäsionsarbeit von Tween 80 gegenüber Heliosol, was bedeutet, dass die Virusformulierung mit Tween 80 deutlich besser an den Blättern und Beeren haftet als mit Heliosol, bei gleicher Spreizwirkung. Bislang unbeachtet sind die allgemeinen toxikologischen Effekte der Formulierung auf Insekten, die relevant sind um einen Breitbandeffekt gegenüber Nützlingen auszuschließen und eine hohe Selektivität gegenüber *D. suzukii* zu erzielen. Hierfür wurde *Drosophila* selbst als Testorganismus ausgewählt. Die Idee ist, dass die Formulierungshilfen im besten Fall keinen negativen Einfluss auf die Überlebensrate von *Drosophila* zeigen. Die Ergebnisse dieser Insekten toxikologischen Tests sind in Abbildung 11 dargestellt. Hierfür wurden Röhrchen mit einer gewissen Anzahl an *D. suzukii* Fliegen besetzt. Die entsprechenden Formulierungshilfen wurden dann in Referenz zur Sucrose an die Fliegen verfüttert, wobei die Anzahl der lebenden Fliegen aufgezeichnet wurde. Deutlich erkennbar ist in Abbildung 11, dass die Anzahl lebender Fliegen bei bereits 1 vol % Heliosol nach kurzer Zeit drastisch einbricht. Somit nimmt das Heliosol eine Sonderrolle bei den getesteten Adjuvantien ein. Tween 80 hingegen zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die Lebensrate der Fliegen. Somit lässt sich aus Abbildung 11 eine Abschätzung der insektiziden Wirkung der Adjuvantien vornehmen (Breitbandeffekt abschätzen).

Abschließend kann zum AP3 festgehalten werden, dass vielseitige Optimierungen an der Virusformulierung stattgefunden haben, mit dem Ergebnis, dass eine sprühfähige Virusformulierung vorliegt, die im basischen pH einen selektiven release zeigt. Darüber hinaus lässt sich die Größe der Virusformulierung, deren Haft- und Spreizfähigkeit, sowie den UV Schutz anpassen. Die Ergebnisse des AP 3 stellen eine solide Grundlage für die folgenden Freilandtests der Virusformulierung dar.

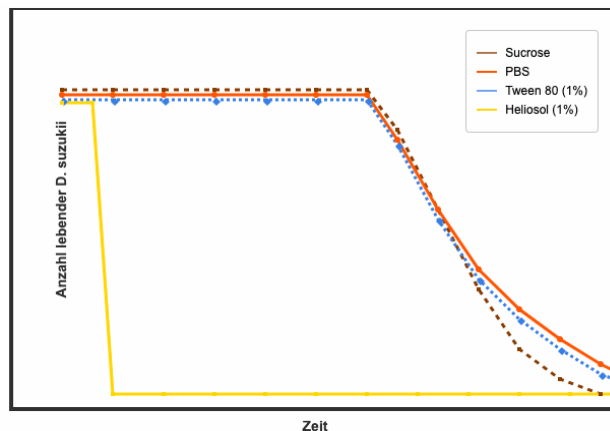


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Survival Analyse von *D. suzukii* nach Fütterung mit Tween 80 und Heliosol.

### AP5 Entwicklung einer Attract and Kill Strategie

Ein grundlegendes Problem bei der Anwendung an Insekten besteht darin, dass die Larven des Dickmaulrüsslers groß und robust sind. Um die Wirkung des bioziden Prinzips zu verbessern, gibt es grundsätzlich zwei Ansätze: Entweder die Dosis der unveränderten Aerokonidien zu erhöhen (quantitativer Ansatz) oder die Virulenz der Aerokonidien zu steigern (qualitativer Ansatz). Im Folgenden wird zunächst auf den quantitativen Ansatz eingegangen.

Zur Steigerung der Menge an Aerokonidien wurde angestrebt, die Ernährungssituation des entomopathogenen Pilzes (EPF) zu verbessern. Die Zugabe von wasserlöslichen Salzen in die Kapseln stellte sich als problematisch heraus, da die Kapselherstellung wasserbasiert erfolgt und während der Zeit im Wasserbad die Salze größtenteils aus den Kapseln herausdiffundieren würden. Darüber hinaus wirken bestimmte Salze der Gelbildung entgegen, was die Stabilität der Kapseln beeinträchtigen würde. Aus diesem Grund wurde mit unlöslichen Substanzen gearbeitet. In Vorarbeiten von K. Hermann wurde gezeigt, dass die Menge an co-formulierter Hefe einen Einfluss auf das Wachstum von *M. brunneum* und insbesondere auf die Ausbildung von Aerokonidien hat (Pest Management Science, 2024, 80, 5131). Leider wurden in diesen Untersuchungen nicht getrocknete Kapseln verwendet. Daher wurde die Menge an Hefe variiert, ebenso die Art der Hefe: Standardmäßig wurde lebende Frischhefe verwendet, aber auch Hefe, die zuvor durch Autoklavieren abgetötet wurde, sowie Hefeextrakt fanden Anwendung. Zur Kostensenkung wurde zusätzlich erwogen, Reststoffströme, wie Hefe von einer lokalen Brauerei, zu nutzen; jedoch konnte dies aus Zeitgründen nicht mehr praktisch umgesetzt werden.

Bedauerlicherweise konnte kein signifikanter Unterschied beim Auswuchs der Aerokonidien festgestellt werden. Es scheint ein maximales Limit an Aerokonidien zu existieren. Genauere Analysen deuteten darauf hin, dass bereits während der Herstellung der Kapseln mit Blastosporen ein Limit an überlebenden Blastosporen besteht – wahrscheinlich ist Sauerstoff der limitierende Faktor für die Zellatmung. Durch diese Limitierung scheint auch die Anzahl der daraus entstehenden Aerokonidien begrenzt zu sein. In den Formulierungen wurden zudem tote Getreidemotten (*Sitotroga cerealella* von Biocare) als preisgünstiger Reststoff eingearbeitet. Um die Größe der Kapseln konstant zu halten, wurde die Menge an Stärke entsprechend reduziert. Verschiedene Mischungsverhältnisse wurden getestet, wobei die Stärke jedoch nicht vollständig substituiert werden konnte, da die Hefe die Motten nicht verstoffwechseln kann. Dies hätte zur Generierung von CO<sub>2</sub> geführt, was zur Anlockung der Insektenlarven erforderlich wäre.

Grundsätzlich wuchs *Metarhizium brunneum* in allen Formulierungen mit *Sitotroga* gut aus. Die besten Ergebnisse wurden bei einer Beimischung von 10 % pulverisierten Motten erzielt. In Auswuchstests auf Agarplatten wurde eine frühere Bildung von Aerokonidien festgestellt, und die Gesamtzahl der Aerokonidien nach 14 Tagen war deutlich erhöht. Diese Ergebnisse konnten jedoch erst zum Ende des Projekts erzielt werden, sodass keine Tests an Insekten durchgeführt werden konnten, um zu prüfen, ob die Erhöhung der Aerokonidienzahl auch die Wirksamkeit verbessert.

Die Gründe für die erhöhte Ausbildung von Aerokonidien bei der Beimischung von Motten konnten bisher nicht geklärt werden. Möglicherweise handelt es sich um eine bessere Nährstoffversorgung, da Insekten eine natürliche Nahrungsquelle für *Metarhizium brunneum* darstellen („artgerechte Ernährung“). Alternativ könnte es damit zusammenhängen, dass die Insekten bereits tot sind; in einem natürlichen Lebenszyklus werden Aerokonidien erst nach dem Tod des Wirts gebildet. Eventuell wurde durch die Beimischung von toten Motten die Bildung von Aerokonidien direkt angeregt, da dem Pilz so suggeriert wurde, er befände sich in der entsprechenden Phase seines Lebenszyklus.

Ein anderer Ansatz zur Verbesserung der Formulierung besteht in der Steigerung der Virulenz der Aerokonidien, also einem qualitativen Ansatz. Der grundsätzliche Ablauf der Infektion von Insekten sieht vor, dass Sporen auf die Insekten cuticula treffen und sich daran anheften. Diese Haftung wird durch Hydrophobine vermittelt. Anschließend keimen die Sporen aus, bilden Appresorien zur mechanischen Verankerung und dringen mit Enzymen (Proteasen, Lipasen, Chitinasen) durch die Cuticula. Eine Hyphie wächst dann durch die Haut hindurch, bis sie das Innere des Insekts erreicht. In der Haemolymphe erfolgt dann die Vermehrung durch Blastosporen, was letztendlich zum Tod des Wirts führt (teilweise durch die Ausschüttung von Destruxinen), woraufhin der Pilz Aerokonidien auf der Wirtsoberfläche zur Infektion des nächsten Insekts bildet. Die Idee, die Haftung der Sporen durch eine vermehrte Bildung von Hydrophobinen zu verbessern, könnte dazu führen, dass ein größerer Anteil der Sporen tatsächlich an den Insekten haftet, was eine bessere und sicherere Infektion zur Folge haben oder gegebenenfalls eine geringere Dosis ermöglichen könnte. Es sollte jedoch nicht die Zeit bis zum Tod des Wirts verkürzt werden, es sei denn, die Anzahl der Hyphen, die die Haemolymphe erreichen, steigt derart an, dass weniger Vermehrungszyklen der Blastosporen nötig sind.

Recherchen in Datenbanken ergaben, dass die Gene, die bei *M. brunneum* für die Produktion von Hydrophobinen verantwortlich sind, über MAPK-Pathways reguliert werden. Falls diese MAPK-Pathways manipuliert werden, könnte eine Hochregulation der entsprechenden Gene erfolgen, was zu einer erhöhten Bildung von Hydrophobinen führen sollte. Laut Literaturrecherche werden diese Pathways durch die Einwirkung von Natriumchlorid (Kochsalz) aktiviert. Der Nachweis des Prinzips erfolgte durch die Festphasenkultivierung: Der Pilz kann auf Nährböden aus PDA kultiviert werden und bildet zunächst eine Mycelschicht, gefolgt von der Bildung von Aerokonidien. Der Agar wurde mit Salz versetzt, wobei in vorherigen Versuchen beim Projektträger Biocare eine maximale Salzkonzentration identifiziert wurde, bei der der Pilz noch ohne Einschränkungen wächst und Aerokonidien bildet. Diese Salzkonzentration wurde verwendet. Die Aerokonidien wurden isoliert und mittels qPCR wurde die Aktivierung der Gene, die für Hydrophobine verantwortlich sind, bestimmt. Es existieren drei Arten von Hydrophobinen. Hydrophobine 2 und 3 zeigten bei Verwendung der Salzplatten eine Hochregulation, während Hydrophobin 1 unverändert blieb. Auch kürzere Salzschocks wurden getestet, zeigten jedoch keine Unterschiede.

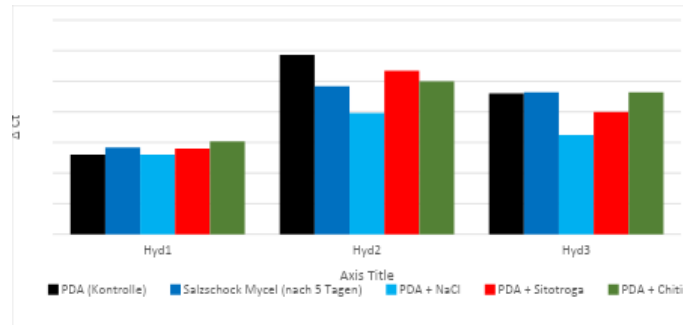


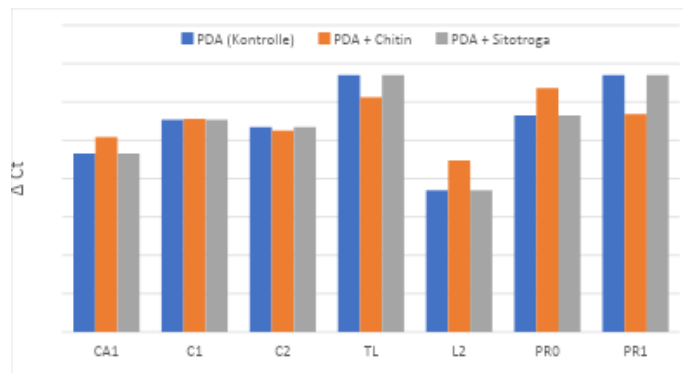
Abbildung 12: Ergebnisse der qPCR. Je kleiner der Balken, desto geringer ist der Unterschied zwischen dem jeweiligen Gen und den House-Keeping-Genen, die als Referenz getestet wurden. Je geringer der Unterschied, desto mehr ist das jeweilige Gen hochreguliert.

Die Infektion der Insekten ist jedoch nicht nur von Hydrophobinen abhängig, sondern auch von anderen Enzymen, die zur Durchdringung der Cuticula benötigt werden. Da die Cuticula von Insekten Chitin enthält, wurde bereits in vorherigen Projekten die Zugabe von Chitin in die Formulierung überprüft. Analog zum salzhaltigen Agar wurde daher auch chitinhaltiger Agar hergestellt. Die darauf wachsenden Aerokonidien zeigten jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Regulierung der Chitinasen.

Es ist jedoch anzumerken, dass Chitinasen nicht das einzige Enzym sind, das für die Infektion von Insekten benötigt wird; im zeitlichen Verlauf der Infektion kommen sie zudem erst spät ins Spiel. Daher wurde die Beimischung von gemahlener Motten als Erweiterung zur Steigerung des Chitinanteils in Betracht gezogen, um auch andere Enzyme als Chitinasen zu steigern. Weiterhin ist es gängige Praxis, den Pilz nicht nur auf Nährböden wachsen zu lassen, sondern ihn regelmäßig Insekten befallen zu lassen (sog. „Wirtspassage“), damit der Pilz nicht evolutionär seine Infektiosität verliert.

Die Verwendung von Motten stellt daher einen Ansatz dar, sowohl die Quantität als auch die Qualität der Sporen zu verbessern. Die auf Chitin- und Mottenagar gewachsenen Aerokonidien wurden ebenfalls mittels qPCR untersucht, wobei neben Hydrophobinen auch Gene getestet wurden, die für Chitinasen, Lipasen und Proteasen verantwortlich sind. Bei den Untersuchungen wurden nur geringfügige Unterschiede festgestellt. Leider ist es nicht möglich Kapseln mit erhöhten Mengen an Natriumchlorid herzustellen (s.o.), aber die Kapseln, die mit verschiedenen Mengen an Sitotroga cerealella formuliert wurden, wurden per qPCR auf die Aktivität der Hydrophobine getestet. Leider konnte nicht festgestellt werden, dass die Beimischung zu einer Hochregulierung der entsprechenden Gene führt. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Anzahl der gebildeten Sporen pro Kapsel durch die Beimischung von toten Motten erhöht werden konnte. Leider konnte jedoch kein Hinweis auf eine gesteigerte Virulenz der einzelnen Sporen gefunden werden.

Abbildung 13: Ergebnisse der qPCR. Je kleiner der Balken, desto geringer ist der Unterschied zwischen dem jeweiligen Gen und den House-Keeping-Genen, die als Referenz getestet wurden. Je geringer der Unterschied, desto mehr ist das



jeweilige Gen hochreguliert. CA1: Endochitinase A1, C1: Endochitinase 1, C2: Endochitinase 2, TL: Triacylglycerol lipase, L2: Lipase 2, PRO: Protease 1-0, PR1: Protease 1-1.

## AP 7 Praxisnahe Versuche

Attract-and-Kill Strategie: Die in AP3 und AP5 erarbeitete i) Virusformulierung und ii) Attract-and-Kill Strategie wurden über die Projektlaufzeit an unterschiedlichen Stellen in praxisnahen Versuchen auf dem Spargel- und Beerenanbau Winkelmann GmbH & Co. KG (Dr. Nadine Winkelmann) auf ihre Praxistauglichkeit hin getestet. Verschiedene Ausbringungsmethoden wurden auf Praktikabilität und Wirtschaftlichkeit geprüft. Eine Exkursion im September 2021 zu Feldern und Verarbeitungsanlagen stellte den Praxisbezug sicher. Während des Projektzeitraums erfolgte die Lieferung von Versuchsmaterialien an die Projektpartner sowie ein begleitendes Schadorganismen-Monitoring.

Auf einem stark von Engerlingen befallenen Heidelbeerfeld (1,73 ha, NRW) wurden zwei unterschiedliche Mittel sowie deren Ausbringungsverfahren hinsichtlich Wirksamkeit und Praxistauglichkeit getestet (2022). Das Feld wurde in drei Abschnitte unterteilt: Reihen 1–10: Behandlung mit Exigon (chemisches Mittel mit Notfallzulassung) über Tropfbewässerung. Reihen 11–20: Negativkontrolle, keine Behandlung. Reihen 21–30: Anwendung von Attracap (biologisches Produkt mit *M. brunneum*) manuell in Wurzelnähe. Beobachtet wurde, dass der Engerlingbefall zum Zeitpunkt der Ausbringung bereits mäßig stark, mit sichtbaren Wurzelschäden vorhanden war. Während des Versuchs verschlechterte sich die Lage weiter – ein kompletter Feldumbruch und Neupflanzung wurden in Betracht gezogen, da der Ertrag stark zurückging. Die Ausbringung erfolgte mit 3 kg/ha Exigon mit 300–500 l Wasser/ha über bestehende Tropfschläuche. Es lag eine zielgerichtete Applikation dank Absperrhähnen vor, wobei nachgespült wurde um eine Vermischung zu vermeiden. Das Ausbringen von Attracap war sehr arbeitsintensiv (4 Personen, 20 Arbeitsstunden auf 0,33 ha) da das Granulat in manuell gestochene Löcher an der Pflanzenwurzel eingebracht wurde. Begleitend zu den Versuchen wurden Drohnenaufnahmen aufgezeichnet (Flächenveränderung über Zeit) und ein Datenlogger ausgebracht, der Daten zur Bodenüberwachung aufzeichnete. Die Ernte des Heidelbeerfeldes fand vom 27. Juni bis 21. August 2022 statt und brachte etwa 2,4 Tonnen weniger Ertrag als im Vorjahr. Grund dafür war ein starker Engerlingbefall mit massiven Wurzelschäden.

Am 14. September 2022 wurden Bodenproben aus allen Versuchsbereichen entnommen und an die FH Bielefeld sowie Biocare zur Analyse geschickt. Gleichzeitig erfolgten stichprobenartige

Grabungen, bei denen nur im Exigon-Bereich ein Engerling gefunden wurde. Aufgrund der hohen Temperaturen und begrenzten Stichproben war das Ergebnis jedoch wenig aussagekräftig. Da der Schaden am Feld zu groß war, wurde im Winter/Frühjahr das gesamte Feld gerodet, der Boden mechanisch und physikalisch saniert und durch neuen Boden ersetzt. Zehn scheinbar gesunde Pflanzen wurden in Töpfen weiterkultiviert. Zwei Jahre später lebten noch fünf, aber nur drei bildeten Blüten, die in Notreife übergingen. Keine Pflanze trug Früchte. Die Sanierung des Feldes erwies sich daher als wirtschaftlich sinnvoll. Die Ausbringung von Attractap verursachte bei Mindestlohn bereits 720 Euro Personalkosten pro Hektar. Steigende Kosten für Energie, Betriebsmittel und qualifiziertes Personal erhöhen den wirtschaftlichen Aufwand zusätzlich und müssen bei der Bewertung berücksichtigt werden.

Am 22.11.2023 wurden in einem Versuchstopf mit hoher Wirkstoffkonzentration lebende Engerlinge gefunden, obwohl das Granulat mit dem Pilz deutlich aufgequollen war. Eine Infektion mit dem Pilz konnte nicht nachgewiesen werden, weshalb der Versuch um vier Wochen verlängert wurde. Auch nach Abschluss am 12.12.2023 zeigte sich keine Wirkung des Pilzes. Von ursprünglich 30 Engerlingen wurden 18 wiedergefunden, alle im Larvenstadium L3. Die höchste Überlebensrate trat im Ansatz mit beschichtetem Material (70 %) auf, während die unbehandelte Kontrolle nur 40 % überlebte. Zusätzlich wurden Erdeulen- und Tipularlarven gefunden. Die Wurzelmasse der Pflanzen war in den behandelten Varianten um bis zu 50 % reduziert, vermutlich durch Fraßschäden. Die ausbleibende Wirkung wird darauf zurückgeführt, dass die Engerlinge bereits zu weit entwickelt waren, als sie mit dem Pilzmaterial in Kontakt kamen, und dieses möglicherweise nicht ausreichend berührt wurde. Für zukünftige Feldversuche wird daher angedacht, das Pilzgranulat gezielt als Barriere zwischen Pflanzreihe und Begrünung einzuarbeiten, um die Engerlinge beim Wandern zum Kontakt mit dem Wirkstoff zu zwingen.

Im Jahr 2024 zeigte sich, dass Pflanzen aus dem ersten Versuchsansatz aufgrund der reduzierten Wurzelmasse schlechter wuchsen, keine Früchte entwickelten und teilweise vertrockneten. Auch Pflanzen aus dem früheren Feldversuch mit Attractap blieben im vegetativen Wachstum und Fruchtansatz deutlich hinter unbehandelten Kontrollen zurück. Der Wurzelschaden durch Engerlinge ließ sich durch die Kulturführung im Topf nicht kompensieren. Unabhängig vom Projektverlauf wurden weitere Pflanzen, Engerlinge und Erde an Projektpartner verteilt und das Freilandmonitoring fortgeführt. 2023 war insgesamt ein Jahr mit hohem Engerlingsdruck und deutlichen Fraßschäden, auch in Erdbeeren. Zudem trat *Drosophila suzukii* (Kirschessigfliege) stark auf, was die Erntequalität in vielen Betrieben verschlechterte. Die Erntezeit bei einem Bio-Heidelbeerbetrieb im Norden verkürzte sich 2023 und nochmals 2024 deutlich. Ein signifikanter Befall mit Dickmaulrüsslern konnte bisher nicht festgestellt werden, weshalb hierzu keine weiteren Versuche erfolgten. Zum Projektabschluss wurde ein Gerät entwickelt (siehe Anhang), das streufähiges Granulat mit Pilzsporen gleichmäßig und tief (ca. 15 cm) am Rand des Pflanzdamms ausbringt. Hintergrund war die beobachtete Wanderbewegung der Engerlinge zwischen Pflanzdamm und Fahrgasse. Die neue Technik schafft eine Art "Pilzbarriere", durch die Engerlinge wandern und sich infizieren sollen.

Das Verfahren ist effizienter, benötigt weniger Personal und reduziert die Applikationskosten deutlich im Vergleich zum ersten Versuch. Es ermöglicht eine präzise, gleichmäßige Ausbringung – auch bei Spezialkulturen mit Folienabdeckung oder in Altanlagen – und behandelt gleichzeitig beide Seiten der Gasse. Ein fertiges, wirksames Granulat hätte so direkt im Freiland getestet werden können.

Virusformulierung: Zwischen dem 2. Juli und dem 2. September 2024 wurde ein Versuch mit zwei Formulierungen eines LaJolla-Virus – einmal mit Hefe und einmal ohne – in abgesicherten Käfigen im Versuchstunnel mit Heidelbeerpflanzen durchgeführt. Ein Freilandversuch war aus Sicherheitsgründen nicht möglich. Pro Formulierung wurden jeweils drei fruchttragende Heidelbeerpflanzen in separaten, feinmaschig abgedichteten Käfigen untergebracht. Am 2. Juli 2024 erfolgte die Applikation der Virusformulierungen, anschließend wurden pro Käfig je 100 *Drosophila suzukii* (50 ♂/50 ♀) freigesetzt. Aufgrund fehlender Funde bei den Kontrollpflanzen wurde am 7. Juli 2024 erneut dieselbe Menge an Fliegen ausgesetzt. Sicherheitsmaßnahmen wie Doppelnetze verhinderten ein Entweichen der Tiere. Besonders im Käfig mit der Virus-Hefe-Formulierung kam es zu starkem Befall durch Käfer, Fliegen und später fliegende Ameisen, was eine deutliche Lockwirkung der Applikation zeigt. Probennahmen der Früchte zur Analyse von Fruchtfestigkeit und Larvenbefall erfolgten am 09.07., 15.07., 02.08. und 13.08.2024. Die letzte Probe war wegen Überreife nicht mehr auswertbar. Ab Mitte Juli wurden Monitoringfallen zur Erfassung der Fliegenaktivität eingesetzt und angepasst, als ab August größere Fliegen auftraten. In den ersten drei Wochen nach Applikation wurden keine adulten Tiere oder Flugbewegungen festgestellt. Ab dem 4. August 2024 jedoch kam es zu starkem Flugaufkommen in den beiden behandelten Käfigen (Hefe und LJV), während die Kontrolle weiterhin frei von Befall blieb.

*Tabelle 1: Fallenkontrolle 13.08.2024*

	FALLENART	SUMME	KEF WEIBCHEN	KEF MÄNNCHEN
<b>KONTROLLE INNEN</b>	Falle mit Deckel	8	6	2
	Offener Becher	39	20	19
<b>LJV</b>	Falle mit Deckel	16	12	4
	Offener Becher	~220	~150	73
<b>HEFE UND LJV</b>	Falle mit Deckel	36	29	7
	Offener Becher	77	60	17
<b>KONTROLLE AUßEN</b>	Offener Becher	36 <i>Drosophila</i> - artige & 50 Großinsekten	2	3

In den behandelten Käfigen war der Anteil weiblicher *Drosophila suzukii* zu allen Zeitpunkten höher als der der Männchen, im Gegensatz zu den Kontrollen und Freilandfängen, wo das Geschlechterverhältnis ausgeglichen blieb. Die Nachkommen der behandelten Tiere waren deutlich größer als die Labortiere, was zu höheren Fangzahlen in offenen Fallen führte. Die Fruchstabilität nahm über die Zeit erwartungsgemäß ab, jedoch verloren die virusbehandelten Früchte schneller an Festigkeit als die unbehandelte Kontrolle. Obwohl in den ersten 21 Tagen keine adulten Tiere beobachtet wurden, traten bereits nach sieben Tagen Larven in den Früchten

auf – am häufigsten bei der LJV-Behandlung mit 11 Larven. Die Larvenzahlen blieben anschließend konstant, jedoch stieg die Zahl gefangener adulter Tiere. Zudem bildete die Virusformulierung nach dem Abtrocknen einen klebrigen Film auf den Früchten, der deren Vermarktbarkeit beeinträchtigt und vom Lebensmitteleinzelhandel vermutlich abgelehnt würde. Auch hier besteht Optimierungsbedarf.

### **Wichtigste Positionen des zahlenmäßigen Nachweises**

Während der Projektlaufzeit sind beim Projektpartner Geohumus in wichtigster Position Personalkosten für den leitenden Mitarbeiter mit einer Teilzeit-Assistenz angefallen, der die Durchführung des Forschungsvorhabens geleitet und durchgeführt hat. Außerdem wurden in geringem Umfang und weit weniger als geplant Mittel für die benötigten Rohstoffe und Verbrauchsmaterialien verausgabt. Des Weiteren fielen noch Kosten für Dienstreisen, sowie den Versand von Formulierungen für Versuche bei den Projektpartnern an. Die bei Antragstellung geplanten Geräte und Laboranlagen mussten nicht angeschafft werden, da zum einen Bestandsmittel genutzt werden konnten, zum anderen Verfahrensschritte bei Fortschritt der Erkenntnisse nicht durchgeführt wurden, wie z.B. das Pelletieren.

### **Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Projektarbeiten**

Die im Projekt durchgeführten Arbeiten waren notwendig und angemessen, um die angestrebten Ziele zur Förderung des biologischen Pflanzenschutzes zu erreichen. Angesichts der wachsenden Bedeutung nicht-chemischer Pflanzenschutzstrategien im Rahmen der Farm-to-Fork-Strategie der EU und der nationalen Ziele zur Reduzierung chemisch-synthetischer Pflanzenschutzmittel bestand ein dringender Bedarf, effektive und praktikable Alternativen zu entwickeln und zu bewerten. Die Auswahl der Arbeitspakete erfolgte auf Basis einer fundierten Problem- und Bedarfsanalyse in enger Zusammenarbeit mit Praxispartnern und wissenschaftlichen Einrichtungen. Die methodische Vorgehensweise – einschließlich der Skalierung von Laborversuchen über Gewächshausversuchen zu Feldversuchen und durchgeführten Wirksamkeitstests – entsprach dem aktuellen Stand von Wissenschaft und Technik und war geeignet, belastbare Aussagen zur Wirksamkeit, Praxistauglichkeit und Wirtschaftlichkeit der untersuchten biologischen Verfahren bzw. Mittel zu ermöglichen. Die Ressourcennutzung im Projekt – personell, zeitlich und finanziell – war effizient und zielgerichtet. Die im Förderzeitraum erbrachten Leistungen stehen in einem angemessenen Verhältnis zu den erzielten Ergebnissen und den formulierten Zielsetzungen des Vorhabens.